

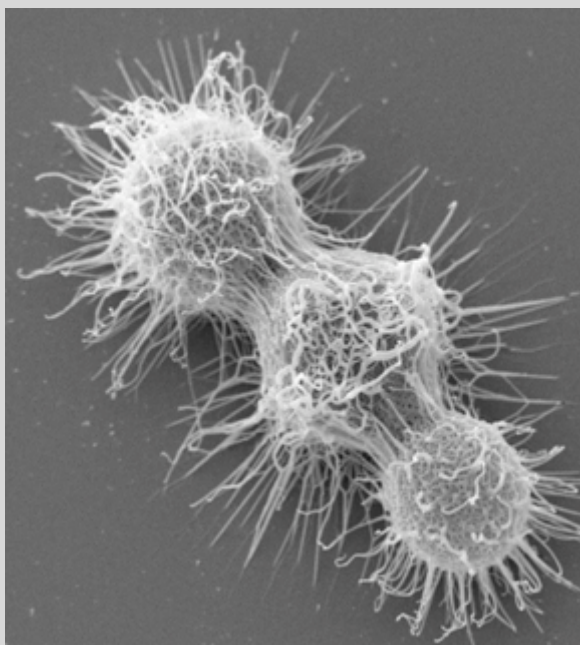


Universitat Autònoma  
de Barcelona

Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques  
Mòdul d'Iniciació a la Recerca

Caracterització de les metal·lotioneïnes  
CnMT1 i CnMT2 del fong  
*Cryptococcus neoformans*

Estudi de la capacitat coordinant davant dels ions  
Zn(II), Cd(II) i Cu(I)



Autor: Jordi Espín Martí

Directors: Mercè Capdevila Vidal  
Òscar Palacios Bonilla

Departament de Química, Facultat de Ciències  
3 de Setembre de 2012



Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i treball de fi de màster corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques.

Jordi Espín Martí  
(signatura)

Vist i plau

Mercè Capdevila Vidal  
(signatura)

Òscar Palacios Bonilla  
(signatura)

Bellaterra 03/09/2012



## Resum

Les metal·lotioneïnes són una gran família de proteïnes amb unes propietats característiques ja que es troben en pràcticament tots els organismes, tenen un baix pes molecular i el seu contingut en residus de cisteïna és alt. Aquest últim fet, els confereix la capacitat de desenvolupar un conjunt de rols relacionats amb l'enllaç dels ions metàl·lics presents al medi i en processos redox. Se les ha classificat com a agents destoxificants i encarregats de la homeòstasi metàl·lica, però avui en dia encara no es coneixen exactament les funcions biològiques que duen a terme aquestes macromolècules.

En aquest treball de recerca, s'han estudiat les dues isoformes de metal·lotioneïna CnMT1 i CnMT2 presents en el fong patògen *Cryptococcus neoformans*, causant de malalties devastadores en pacients immunodeficients. Recentment s'ha descobert que aquest fong té com a factor de virulència, entre d'altres, els nivells de coure del medi on es troba, per tant, s'hi veuran involucrats tots aquells mecanismes que permetin accedir i transportar aquest metall per modificar la seva capacitat d'infecció. Com a conseqüència, és de gran rellevància la caracterització de les seves metal·lotioneïnes i així classificar-les segons Cu- o Zn-tioneïnes.

Amb aquest propòsit, s'ha treballat amb produccions d'aquestes proteïnes preparades pel Grup de Recerca de la Dra. Atrian de la UB, que presenten una elevada puresa i concentració. Les dues isoformes produïdes en medis rics en Zn(II) s'han utilitzat per a fer valoracions amb Cu(I) i Cd(II), i s'ha seguit l'evolució dels experiments mitjançant les tècniques espectroscòpiques DC i de UV-vis, i l'espectrometria ESI-MS.

S'ha pogut observar que les dues isoformes tenen preferència per enllaçar Cu(I) tot i que no es poden considerar Cu-tioneïnes genuïnes com la paradigmàtica Cup1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Per altra banda també s'ha establert una gran homologia entre les dues seqüències, ja que es poden alinear clarament els residus cisteïnics que es troben agrupats en blocs i separats per fragments espaiadors amb aminoàcids no coordinants.



## **Agraïments**

En primer lloc vull donar les gràcies a la Dra. Mercè Capdevila per haver confiat en mi i donar-me la oportunitat de formar part del seu Grup de Recerca durant l'estada de col·laboració i el Màster.

També agrair tot el seguiment i els consells del Dr. Òscar Palacios al llarg d'aquest temps, que m'han ajudat a comprendre millor el món de la Bioinorgànica.

A la Dra. Sílvia Atrian i al seu Grup de Recerca del Departament de Genètica de la UB per proveir-nos de les proteïnes amb les que s'ha treballat i al SAQ, per la instrumentació i ajuda a l'hora de realitzar els experiments.

Per altra banda donar moltes gràcies als companys del Màster pel bon ambient viscut durant aquest any. Als companys de Grup: la Sílvia, la Cata, la Katia, en Joan, la Maribel i la Mireia, amb els que es fa molt més fàcil treballar, els hi vull agrair sincerament tota l'ajuda i amabilitat.

A la meva família agraeixo tot el suport que sempre m'ha donat sense el qual mai no hagués pogut arribat fins aquí. I a la Sara, que ha estat al meu costat en tot moment.





## Glossari

*C.n.*: *Cryptococcus neoformans*

CnMT: Metal·lotioneïna de l'espècie *Cryptococcus neoformans*

Cys: Cisteïna

DC: Espectroscòpia Dicroisme Circular

*E. coli*: *Escherichia coli*

eq: Equivalent

ESI-MS: Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai

His: Histidina

ICP-AES: Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció

Met: Metionina

MT / MTs: Metal·lotioneïna / Metal·lotioneïnes

UV-vis: Espectroscòpia ultravioleta-visible



# Índex

<b>1 Introducció</b>	1
1.1. Les metal·lotioneïnes	1
1.1.1. Funcions biològiques	1
1.1.2. Classificació	2
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	4
1.2.1. MTs de <i>Cryptococcus neoformans</i>	5
<b>2 Objectius</b>	6
<b>3 Resultats i discussió</b>	7
3.1. Caracterització de les CnMTs obtingudes <i>in vivo</i>	7
3.1.1. CnMT1	7
3.1.2. CnMT2	9
3.2. Valoració de Zn-CnMT1 amb Cu(I)	11
3.3. Valoració de Zn-CnMT1 amb Cd(II)	13
3.4. Valoració de Zn-CnMT2 amb Cu(I)	17
3.5. Valoració de Zn-CnMT2 amb Cd(II)	21
3.6. Alineament de les seqüències de CnMT1 i CnMT2	24
<b>4 Procediment experimental</b>	27
4.1. Caracterització de les proteïnes	27
4.1.1. Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció	27
4.1.2. Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai	28
4.1.3. Espectroscòpia de dicroisme circular i d'absorció UV-vis	29
4.2. Agents valorants	30
<b>5 Conclusions</b>	31
<b>6 Bibliografia</b>	32



# 1. Introducció

## 1.1. Les metal·lotioneïnes

Les metal·lotioneïnes (MTs) són una família de metal·loproteïnes de baix pes molecular (30-100 aminoàcids), amb una gran estabilitat tèrmica, i que presenten un alt contingut en cisteïnes (Cys) dins la seva cadena d'aminoàcids ( $\approx 30\%$ ) [1]. El fet de presentar un nombre important d'àtoms de sofre en forma de tiols, els hi confereix una gran capacitat coordinant davant de metalls pesants mitjançant enllaços metall-tiolat, generant així clústers metàl·lics. Aquests són els encarregats de proporcionar a les MTs la seva estructura tridimensional, que es veu determinada pel tipus i/o estequiometria dels metalls coordinats, en forma d'holoproteïna, ja que en la seva forma d'apoproteïna no tenen estructura secundària ni terciària pròpies. Ocasionalment, altres aminoàcids com la histidina (His) o bé altres lligands inorgànics ( $\text{Cl}^-$  o  $\text{S}^{2-}$ ) poden participar a la coordinació metàl·lica [2, 3].

Va ser al 1957 quan Margoshes i Vallee van descobrir unes proteïnes situades al còrtex renal de cavall, les quals acumulaven el cadmi i zinc [4]. Aquest descobriment va donar lloc a una nova família de proteïnes, a la qual ja s'han afegit MTs de més d'un centenar d'organismes, com ara plantes, animals i cianobacteris.

Actualment un gran ventall de disciplines com la física, la medicina o la química dediquen àrees d'estudi a aquest tipus de macromolècules, donades les seves propietats peculiars i al fet que encara avui en dia no s'hagin assignat totalment les seves funcions biològiques [5-7].

### 1.1.1. Funcions biològiques

L'assignació d'un rol biològic a aquestes macromolècules tant estudiades en els darrers 50 anys ha estat, i és, un dels seus principals reptes, i s'ha convertit en una qüestió de principal rellevància [8] entre els investigadors de l'àrea. El problema no rau en la manca d'observació d'un determinat comportament d'aquestes proteïnes, sinó que es troben implicades en una gran quantitat de processos fisiològics, els quals varien normalment entre diferents espècies i per les isoformes d'un mateix organisme [6, 9]. Per això, s'espera poder associar una funció o funcions per a grups de MTs i no una única funció per al conjunt d'aquestes proteïnes.

Degut a la seva peculiar composició d'aminoàcids, se'ls hi atribueixen les funcions d'unió de metalls i d'activitat redox, reactivitat característica dels àtoms de sofre, en aquest cas provinents dels residus de Cys que contenen les MTs. Aquestes dues capacitats químiques estan involucrades en un gran nombre de processos biològics que dependran de les necessitats fisiològiques de cada organisme en particular [2]. Se les ha trobat implicades en processos d'emmagatzematge i regulació de metalls essencials com Zn i Cu, o bé com a protectors

davant la toxicitat d'altres metalls, com per exemple Cd i Hg. També es creu que poden actuar com a destoxificadors de radicals lliures, emprant el caràcter reductor dels grups tiolat [6].

Adicionalment, cal tenir en compte que la conservació dels gens de MTs en totes les branques de l'arbre de la vida i la gran diversificació de les isoformes, està relacionat amb la capacitat d'adaptació d'aquestes i la seva utilitat en funcions molt diferents.

### 1.1.2. Classificació

Cap als anys 80 ja s'havien estudiat un cert nombre de MTs, com ara les isoformes MT1 i MT2 de mamífer, i la Cup1 de llevat, entre d'altres menys estudiades. Pel fet que el grup de proteïnes conegudes s'anava fent cada cop més gran, i per les seves particularitats, que impediien la seva classificació en base a la seva funció, com es fa amb la resta de proteïnes, va ser necessari establir un sistema particular de classificació de les mateixes. Va ser al 1985, durant la Segona Conferència Internacional de Metal·lotioneïnes, quan es va proposar la classificació de les MTs en tres classes. Aquesta classificació, en base a la homologia de la seqüència d'aminoàcids, va consistir en la següent [10].

- Classe I: espècies homòlogues a les isoformes MT1 i MT2, aïllades de ronyó de cavall (60-62 aminoàcids, 20 Cys). Inclou MTs d'alguns vertebrats, crustacis i mol·luscs.
- Classe II: no homòlogues a les isoformes de mamífer, constituïda principalment per MTs de plantes, fongs, cianobacteris i molts invertebrats.
- Classe III: pèptids sintetitzats enzimàticament (fitoquelatines i cadistines).

Aquesta classificació, que va ser emprada durant força temps, ha anat quedant obsoleta degut a la gran variabilitat en les característiques de les MTs de classe II i al descobriment de noves MTs. Amb el propòsit de millorar-la, Binz i Kägi van establir una nova classificació 15 anys després. Aquesta nova manera de classificar-les es basa en l'agrupació de MTs segons les semblances seqüencials, tenint en compte relacions filogenètiques. Malgrat això, aquesta classificació no considera la funció, reactivitat o evolució de les MTs, i dona lloc a tantes classes com famílies existeixen en els regnes animal i vegetal [11].

Recentment, el nostre Grup de Recerca va proposar una nova classificació de les MTs considerant criteris funcionals i relacionant les capacitats coordinants davant Zn(II) i Cu(I) amb el seu paper en els sistemes biològics [9, 12]. Així es consideren dos tipus de comportaments extrems: Cu-tioneïnes i Zn-tioneïnes, tot i que aquesta classificació realment acaba essent una gradació entre aquests dos extrems.

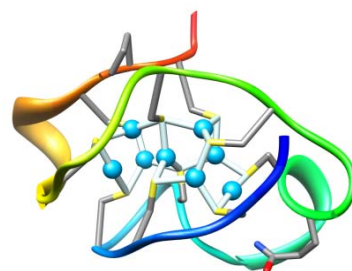
Són Cu-tioneïnes aquelles MTs que presenten una gran afinitat pel Cu(I), i donen lloc, en medis rics en Cu, a una única espècie homometàl·lica Cu-MT. Les Zn-tioneïnes, que presenten unes característiques òptimes per enllaçar Zn(II), quan es biosintetitzen en medis

rics en aquest metall donen lloc a una única espècie homometal·lica Zn-MT, però en medis rics en Cu(I) formen diverses espècies amb clústers heterometal·lics que contenen Zn(II) i Cu(I).

S'han classificat, en treballs anteriors del nostre Grup, les MTs de *Saccharomyces cerevisiae* Cup1 i la isoforma MT1 de mamífer com a paradigmes respectius de Cu-tioneïna i Zn-tioneïna. D'aquestes dues metal·lotioneïnes se'n disposa molta informació, fins i tot es coneixen les seves estructures tridimensionals (Figures 1 i 2) [13, 14].

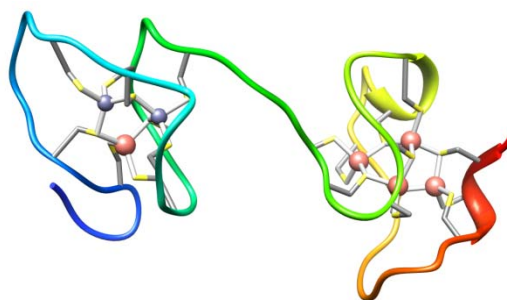
La Cup1 del llevat *S. cerevisiae*, està constituïda per 53 aminoàcids, amb un sol domini que conté 12 Cys. Cal destacar aquí que en aquesta MT, només 10 Cys coordinen els ions metal·lics, i que coexisteixen els entorns  $\text{CuS}_2$  i  $\text{CuS}_3$  pels Cu(I) enllaçats [13].

**Figura 1.** Estructura de la  $\text{Cu}_8$ -Cup1 nativa del llevat *Saccharomyces cerevisiae* obtinguda per difracció de raigs X (referència Protein Data Bank 1RJU). Els ions Cu(I) es mostren en blau.



La isoforma MT2 de mamífer (molt semblant a la MT1) presenta una estructura primària amb 60 aminoàcids, entre els quals s'hi troben 20 Cys. En enllaçar Zn(II) i Cd(II), aquesta proteïna s'estructura en dos dominis, anomenats  $\alpha$  (C-terminal) i  $\beta$  (N-terminal), que contenen clústers amb quatre i tres centres metal·lics, respectivament. En els dos dominis, els ions coordinats presenten geometries tetraèdriques, tipus  $\text{MS}_4$ .

**Figura 2.** Estructura de la  $\text{Cd}_5\text{Zn}_2$ -MT2 nativa de mamífer obtinguda per difracció de raigs X (referència Protein Data Bank 4MT2). Els ions Cd(II) es mostren en color salmó i els Zn(II) en gris.



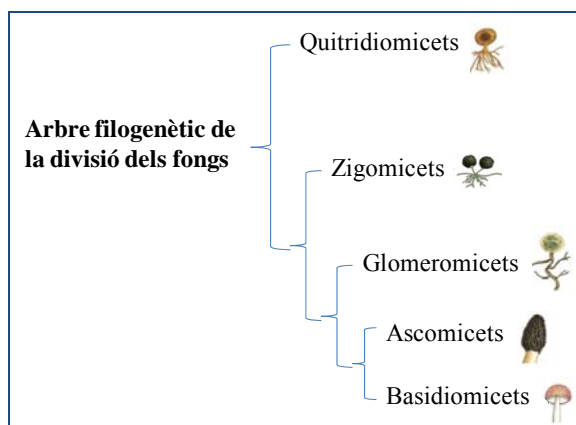
Des dels primers estudis en aquest camp, es coneixia que les MTs d'eucariotes unicel·lulars (fongs i llevats) compartien dues característiques peculiars: contien MTs de mida petita i eren classificades com altament afins al Cu(I) [15]. Les dues característiques es van definir per a Cup1 de *Saccharomyces cerevisiae*, però també les compartien MTs d'altres organismes com *Agaricus*, *Neurospora*, *Candida* o *Yarrowia*. Aquests resultats semblaven indicar que les MTs, en els organismes més primitius, eren Cu-tioneïnes i que posteriorment van aparèixer les Zn-tioneïnes a partir de l'evolució dels metazous. Aquesta hipòtesi va quedar invalidada degut a la descripció de Zn-tioneïnes de fongs i llevats, com són *Magnaporthe grisea* i *Heliscus lugdunensis* [16].

En els últims anys s'ha investigat profundament el metabolisme del Cu en aquests organismes, ja que aquest metall ha estat relacionat amb la virulència i patogenicitat d'alguns fongs. Alguns casos destacables són els de *Cryptococcus neoformans* i *Tetrahymena thermophila*, eucariotes unicel·lulars dels que s'han aïllat diverses isoformes de MTs.

## 1.2. *Cryptococcus neoformans*

El *Cryptococcus neoformans* (*C.n.*) és un fong oportunista del medi, patògen per a humans immunodeficients, com ara pacients de SIDA, trasplantats o pacients que reben medicació immunosupressora, així com pacients amb malalties que afecten a la sang, medul·la òssia i ganglis limfàtics [17-19]. També pot causar malalties a una gran varietat de mamífers, insectes i ocells. Es troba en sòls, en plantes i en excrements de colom i es transmet com a llevat o espòria. La infecció inicial amb *C.n.* es produeix per inhalació d'espores o cèl·lules assecades del fong presents a l'ambient. Des dels pulmons, els fongs es disseminen a altres òrgans a través del torrent sanguini, arribant finalment al sistema nerviós central causant una meningoencefalitis devastadora [17, 20].

El *C.n.* forma part de la família dels Basidiomicets (Figura 3) dins del regne dels fongs, i té molta més semblança als bolets que no pas a la família dels Ascomicets, a la qual pertany el *Saccharomyces cerevisiae*. El *Cryptococcus neoformans* és un llevat encapsulat i esfèric, d'uns 5-10 µm de diàmetre que es reproduïx per gemmació. Tolerà temperatures ambientals baixes i pot sobreviure a 37 °C [21].



**Figura 3.** Classificació de les diferents famílies dins del regne dels fongs, basada en la seqüència del gen que codifica el RNA de la subunitat petita dels ribosomes.

Els factors que afecten a la virulència del *C.n.* són diversos, però recentment s'ha descobert que el Cu pot tenir un rol crític en la virulència d'aquest fong [20-22]. Es coneix que la capacitat de producció de melanina per part del fong depèn d'un enzim que requereix Cu per actuar. La importància de la melanina recau en la protecció de la cèl·lula davant d'altres temperatures, destoxificació de radicals lliures i altres tipus d'estrès. Per altra banda, el Cu és un cofactor crític per a les multi-Cu oxidases involucrades en l'alta afinitat per a captar Fe(II), essent el Fe un altre factor de la virulència del fong [22, 23].



Per aquest fet, l'estudi de la homeòstasi de Cu en el fong patogen *Cryptococcus neoformans* es considera de gran rellevància, ja que en trobar-se en medis amb nivells alts o baixos de Cu, aquest presentarà una virulència accentuada o atenuada, respectivament. Com a conseqüència, la caracterització de les metal·lotioneïnes que conté el *C.n.* és una font molt important d'informació per a esbrinar més detalladament el comportament d'aquest fong.

### 1.2.1. MTs de *Cryptococcus neoformans*

Com s'observa a la Figura 4, les estructures primàries de les dues isoformes de MT conegudes de *C.n.*, que anomenarem CnMT1 i CnMT2, tenen una llargada considerablement major que les conegudes per a altres fongs i llevats, i conseqüentment el nombre de Cys també és més elevat del comú. En cap de les dues proteïnes s'ha detectat His, aminoàcid present en totes les Zn-tioneïnes de llevats. També s'aprecien dos tipus de disposicions de les Cys dins de les seqüències de les MTs, del tipus X-C-X i X-CC-X, tot i que aquest fet no és indicatiu de la preferència d'enllaç a un determinat metall.

CnMT1:

GSMA<sup>Met</sup>CN<sup>Cys</sup>CPPQKNTACCSTSEAQDKCTCQKGNCECKACPNSTKTSES<sup>Cys</sup>GGKASTCNC<sup>Cys</sup>GGSGEACTCPPGQCACDKCPK  
KAKSVSTCGCGGSGAACSCPPGKCA<sup>Cys</sup>CDNCPKQAQEKVSSCACSGSGAA

CnMT2:

GSPEFMAFNPNPEKTTSCCSTSKAQDKCTCPKGKCECETCPKSTKTPGSGPCNCGVKEKVSTCGCNGSGAACTCPP  
GQCACDS<sup>Cys</sup>CPKAKSVSTCGCGGSAAA<sup>Cys</sup>CPPGKCA<sup>Cys</sup>CDSCPKQAQEKVSSCACNGSGGACTCPPGKCS<sup>Cys</sup>SGCPAQAK  
ENPADQPTT<sup>Cys</sup>CGCQGVGVA<sup>Cys</sup>CTCPPGQCA<sup>Cys</sup>DGCPAKAK

**Figura 4.** Seqüència aminoacídica de les dues isoformes de MT de *Cryptococcus neoformans* CnMT1 i CnMT2. En vermell es marquen les Cys i en blau les Met.

La isoforma CnMT1 està formada per 123 aminoàcids, dels quals 25 són Cys, mentre que la isoforma CnMT2 està formada per 184 aminoàcids, dels quals 37 són Cys. Tenint en compte la seva composició aminoacídica, cal esperar que les capacitats coordinats d'aquestes MTs no siguin exactament idèntiques degut al diferent nombre de Cys, però el seu caràcter de Zn- o Cu-tioneïnes resta encara per determinar.

## 2. Objectius

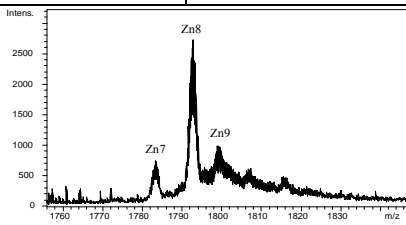
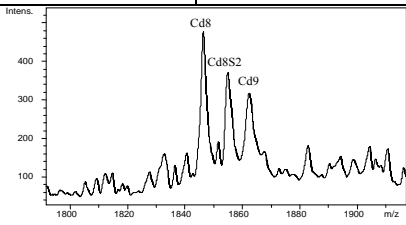
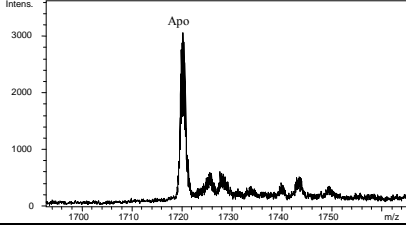
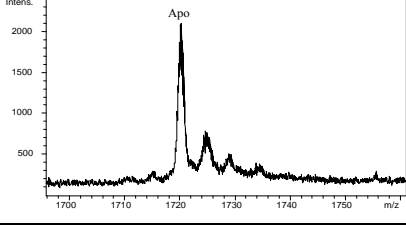
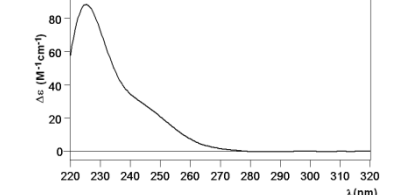
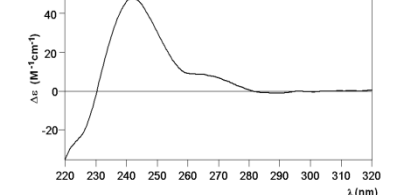
L'objectiu d'aquest treball de recerca és estudiar i determinar la capacitat de les dues isoformes recombinants de MT de *Cryptococcus neoformans* per a coordinar Zn(II), Cd(II) i Cu(I) per tal de poder-les classificar com a Zn- o Cu-tioneïnes.

Per a aconseguir aquest objectiu global s'han considerat els següents objectius parcials:

- Caracterització de les espècies obtingudes *in vivo* en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II) per a les dues isoformes (CnMT1 i CnMT2), emprant tècniques espectroscòpiques (DC, UV-vis i ICP-AES) i espectrometria de masses (ESI-TOF MS)
- Estudi del desplaçament *in vitro* de Zn(II) per Cd(II) en les espècies Zn-CnMT1 i Zn-CnMT2 obtingudes *in vivo*, mitjançant DC, UV-vis i ESI-TOF MS.
- Estudi del desplaçament *in vitro* de Zn(II) per Cu(I) en les espècies Zn-CnMT1 i Zn-CnMT2 obtingudes *in vivo*, mitjançant DC, UV-vis i ESI-TOF MS.
- Comparació del comportament d'ambdues isoformes, tant *in vivo* com *in vitro*.

### 3. Resultats i discussió

En aquest apartat del treball es mostren els resultats obtinguts en la caracterització de les dues isoformes recombinants de MT de *Cryptococcus neoformans*, CnMT1 i CnMT2, obtingudes *in vivo* en cèl·lules d'*E. coli* en medis enriquits amb Cd(II), Cu(II) i Zn(II). Pel que fa a les produccions amb Cu(II), cal remarcar que es van realitzar a oxigenació normal i a baixa oxigenació, ja que s'ha observat que el grau d'aeració del cultiu afecta al contingut en Cu(I) dins la cèl·lula, i per tant, al seu contingut en les MTs [24]. També es presenten els resultats dels estudis *in vitro* referents al desplaçament de Zn(II) per Cd(II) i Cu(I) en les espècies Zn-CnMT1 i Zn-CnMT2 biosintetitzades.

		Zn-CnMT1		Cd-CnMT1	
ICP-AES		Normal	Àcid	Normal	Àcid
	[prot] (M)	$0.21 \cdot 10^{-4}$	$0.22 \cdot 10^{-4}$	$<0.04 \cdot 10^{-4}$	$0.04 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	8.8	8.5	<LD	<LD
	Cd/MT	<LD	<LD	9.1	8.4
	Cu/MT	<LD	<LD	<LD	<LD
<b>Espectres ESI-MS:</b> pH 7.0					
					
<b>Espectre DC</b>					

**Taula 1.** Resultats d'ICP-AES, d'ESI-MS i DC corresponents a les produccions de CnMT1 en medis rics amb Zn(II) i Cd(II).

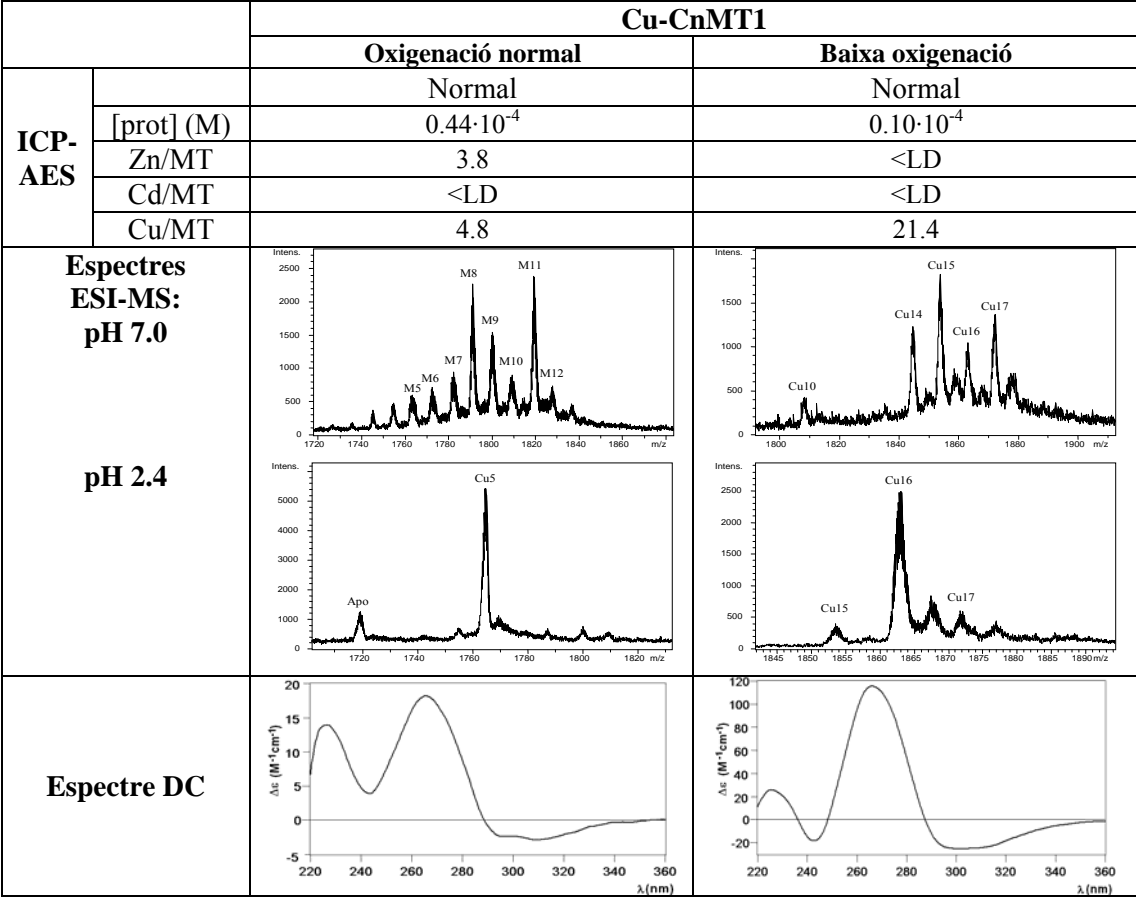
#### 3.1. Caracterització de les CnMTs obtingudes *in vivo*

##### 3.1.1. CnMT1

La biosíntesi de CnMT1 en medis rics en Zn(II) (Taula 1) dóna lloc a la formació d'una espècie majoritària Zn<sub>8</sub>-CnMT1, tot i que també s'observa la presència d'altres espècies de menor abundància com Zn<sub>9</sub>- i Zn<sub>7</sub>-CnMT1 en l'espectre d'ESI-MS. Aquestes dades estan d'acord amb el contingut metàl·lic determinat per ICP-AES. L'espectre de DC d'aquesta

preparació mostra una banda gaussiana centrada a 240 nm corresponent a l'enllaç Zn-Cys, la qual es solapa amb la banda deguda a l'enllaç peptídic a 220-230 nm.

La producció de CnMT1 en medis rics en Cd(II) (Taula 1) dóna lloc a una espècie Cd<sub>8</sub>-majoritària, juntament amb Cd<sub>9</sub>- i un tercer pic, assignat com a Cd<sub>8</sub>S<sub>2</sub>-CnMT1 donada l'absència de Zn en els resultats d'ICP-AES. L'espectre de DC d'aquesta preparació permet observar un solapament entre dues gaussianes centrades respectivament a 245 i 270 nm.



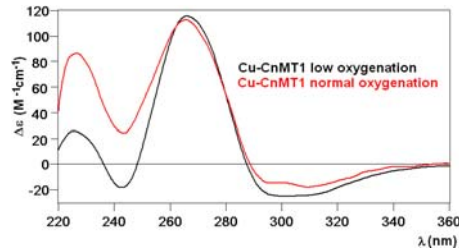
**Taula 2.** Resultats d'ICP-AES, d'ESI-MS i DC de les produccions de CnMT1 en medis rics amb Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i baixa.

L'espectre de masses obtingut en la bioproducció de CnMT1 en medis rics en Cu(II) amb nivells normals d'oxigenació (Taula 2) mostra un conjunt d'espècies heterometàl·liques M<sub>x</sub>-CnMT1, on M=Zn+Cu i x=5-12, essent M<sub>11</sub>- M<sub>8</sub>- i M<sub>9</sub>-CnMT1 les majoritàries. Les dades d'ICP-AES indiquen la presència d'una quantitat semblant de Zn i Cu, confirmant així la naturalesa heteronuclear dels seus agregats metàl·lics. L'espectre de DC d'aquesta preparació presenta una banda gaussiana amb màxim a 265 nm, típica d'algunes espècies Cu-MT i absorpcions a 300-340 nm característiques de Cu-tioneïnes.

Quan el medi és enriquit en Cu(II) i el nivell d'oxigenació és baix, la producció presenta com a espècie majoritària la Cu<sub>15</sub>-CnMT1, tot i que amb menor intensitat s'observen les Cu<sub>17</sub>-, Cu<sub>14</sub>- i Cu<sub>16</sub>-CnMT1. La biosíntesi de la CnMT1 en aquestes condicions, dóna lloc a un

espectre de DC amb una gaussiana centrada a 270 nm i unes absorcions entre 300 i 340 nm específiques de punts d'unió de Cu(I).

La Figura 5, en la que es mostren els espectres normalitzats de DC de les produccions de Cu-CnMT1 a baixa i normal oxigenació, revela l'elevada similitud d'ambdues produccions en termes d'empremta de DC.



**Figura 5.** Superposició de les empremtes de DC normalitzades de Cu-CnMT1 en les dues condicions d'aeració del cultiu.

		<b>Zn-CnMT2</b>		<b>Cd-CnMT2</b>	
<b>ICP-AES</b>		Normal	Àcid	Normal	Àcid
	[prot] (M)	$0.77 \cdot 10^{-4}$	$0.80 \cdot 10^{-4}$	$0.04 \cdot 10^{-4}$	$0.06 \cdot 10^{-4}$
	Zn/MT	11.10	10.89	<LD	<LD
	Cd/MT	<LD	<LD	17.5	12.5
	Cu/MT	<LD	<LD	<LD	<LD
<b>Espectres ESI-MS: pH 7.0</b>					
<b>Espectre DC</b>					

**Taula 3.** Resultats d'ICP-AES, d'ESI-MS i DC obtinguts de les produccions de CnMT2 en medis rics en Zn(II) i Cd(II).

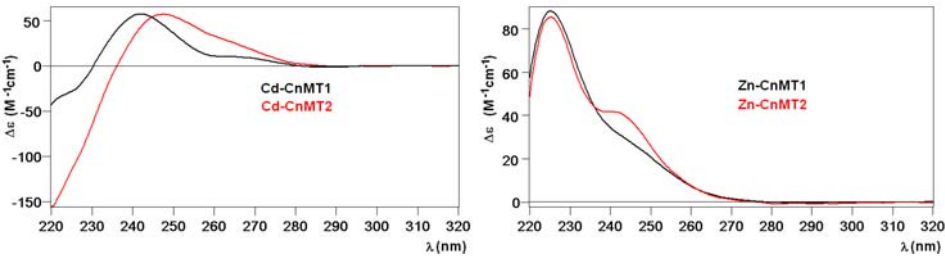
### 3.1.2. CnMT2

La bioproducció de CnMT2 en medis rics en Zn(II) (Taula 3) dona lloc a Zn<sub>11</sub>-CnMT2 com a espècie majoritària, juntament amb d'altres de menor intensitat com Zn<sub>12</sub>- i Zn<sub>10</sub>-CnMT2. Aquest contingut metàl·lic és corroborat amb les dades d'ICP-AES. L'espectre de DC d'aquesta preparació és molt similar a l'enregistrat en la producció de Zn-CnMT1, mostrant el solapament de les dues gaussians positives centrades a 230 i 240 nm, les quals

corresponen a l'absorció de l'enllaç peptídic i de clústers amb Zn, respectivament.

La producció de CnMT2 en medis enriquits en Cd(II) genera dues espècies amb intensitat similar, Cd<sub>15</sub>- i Cd<sub>13</sub>-, juntament amb Cd<sub>14</sub>-CnMT2 de més baixa intensitat. La seva empremta al DC presenta un espectre amb una banda gaussiana centrada a 245 nm característica d'agregats proteics amb Cd(II).

Els espectres de DC de les dues isoformes produïdes en Zn(II) i en Cd(II) són força similars, tot i que la banda de Cd-CnMT2 es veu desplaçada a la dreta (Figura 6).



**Figura 6.** Espectres de DC normalitzats i superposats de les dues isoformes CnMT1 i CnMT2 enllaçades a Zn(II) i a Cd(II).

		Cu-CnMT2	
		Oxygenació normal	Baixa oxygenació
ICP-AES		Normal	Normal
	[prot] (M)	0.12·10 <sup>-4</sup>	0.25·10 <sup>-4</sup>
	Zn/MT	5.9	2.1
	Cd/MT	<LD	<LD
	Cu/MT	5.4	21.4
Espectres ESI-MS: pH 7.0			
pH 2.4			
Espectre DC			

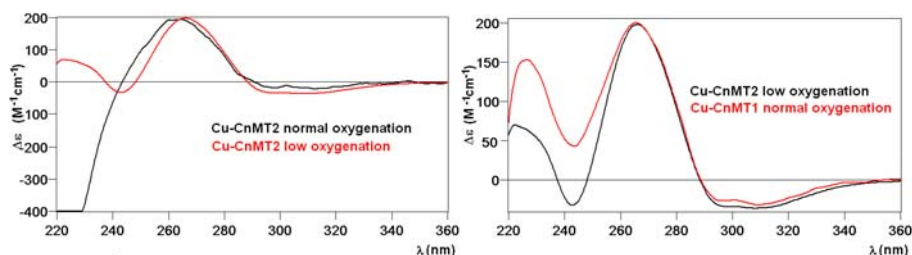
**Taula 4.** Resultats d'ICP-AES, d'ESI-MS i DC corresponents a la producció de CnMT2 en medis rics amb Cu(II), en condicions d'oxigenació normal i baixa.

Pel que fa a la producció de CnMT2 en medis enriquits amb Cu(II) amb nivells d'oxigenació normal, (Taula 4) els espectres de masses permeten observar un conjunt d'espècies heterometàl·liques (en base a les dades d'ICP-AES) del tipus M<sub>x</sub>-CnMT2 on

$M=Zn+Cu$  i que presenten valors de  $x$  entre 6 i 16, essent  $M_{11}$ -CnMT2 l'espècie amb màxima intensitat. L'espectre de DC d'aquesta preparació mostra una absorció poc intensa en forma de gaussiana a una longitud d'ona de 260 nm, indicant probablement una baixa estructuració de les espècies formades.

Contràriament, la producció de CnMT2 en medi enriquit amb  $Cu(II)$  a baixa oxigenació mostra també la presència de Zn (Taula 4), tot i que aquest cop minoritària respecte al Cu, donant lloc a espècies que també presenten naturalesa heterometàl·lica, amb  $M_{24}$ -CnMT2 com a espècie amb major intensitat, juntament amb altres espècies que mostren pics menys intensos (de  $M_{19}$  a  $M_{23}$  i també  $M_{25}$ -CnMT2). L'espectre de DC d'aquesta preparació mostra una intensitat clarament més gran que la de la producció a oxigenació normal, indicant una major estructuració de les espècies formades. En l'espectre es poden observar un conjunt de bandes, tant positives com negatives, característiques de les espècies Cu-Cys.

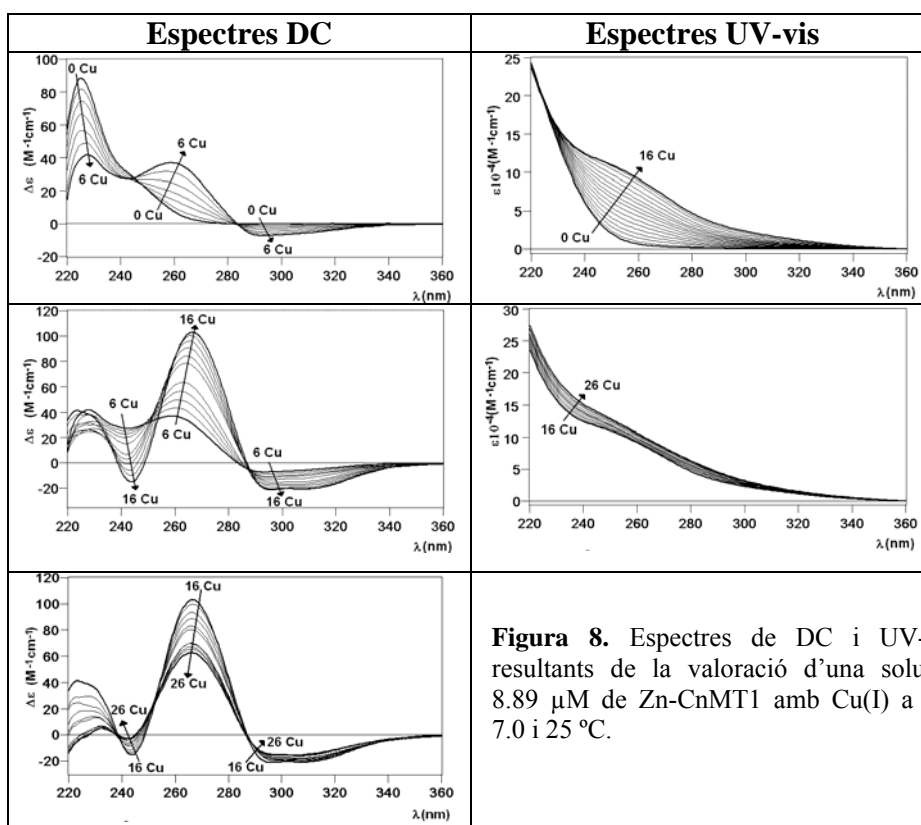
És interessant veure a la Figura 7 com les dues empremtes del DC de les preparacions Cu-CnMT2 obtingudes *in vivo* a oxigenació normal i baixa són molt similars si es normalitzen les intensitats, però també es pot observar en la superposició que els espectres de DC de les preparacions de les dues isoformes CnMT1 i CnMT2 biosintetitzades en medis rics en  $Cu(II)$  a oxigenació normal i baixa, respectivament, són també pràcticament idèntiques.



**Figura 7.** Superposició de les empremtes de DC normalitzades de Cu-CnMT2 en les dues condicions d'aeració del cultiu, i comparació de Cu-CnMT2 a baixa oxigenació i Cu-CnMT1 a oxigenació normal.

### 3.2. Valoració de Zn-CnMT1 amb $Cu(I)$

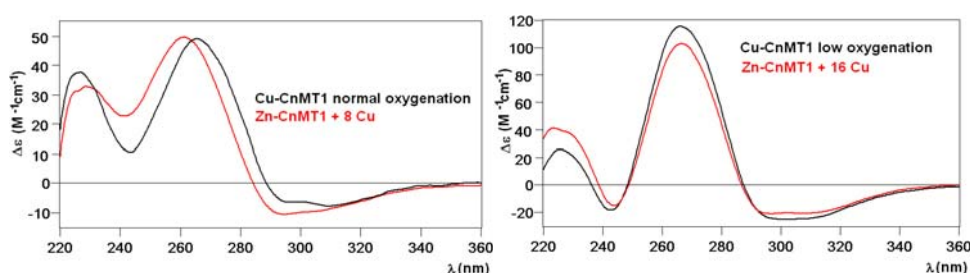
Per tal d'estudiar el desplaçament de  $Zn(II)$  per  $Cu(I)$  en la preparació Zn-CnMT1, es van anar afegit successivament diversos equivalents de  $Cu(I)$  sobre una solució de Zn-CnMT1, a pH 7.0 i a 25 °C, obtenint-se així espècies Cu-CnMT1 formades *in vitro*. Aquest desplaçament metàl·lic va ser seguit per espectroscòpia de DC i UV-vis, i les al·lquotes recollides cada 2 eq de  $Cu(I)$  afegits van ser analitzades per ESI-MS tant a pH 7.0 com a pH 2.4. D'aquesta manera l'estudi a pH 7.0 permet avaluar el contingut metàl·lic conjunt M (on  $M=Zn+Cu$ ) i a pH 2.4 s'observa exclusivament el nombre d'ions  $Cu(I)$  units a la MT.



**Figura 8.** Espectres de DC i UV-vis resultants de la valoració d'una solució 8.89  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT1 amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Els espectres de DC i UV-vis obtinguts en la valoració de Zn-CnMT1 amb Cu(I) (Figura 8) mostren la presència de 3 etapes diferents. En la primera etapa, de 0 a 6 eq de Cu(I) afegits, s'observen 3 punts isodicroics i mentre disminueix la banda centrada a uns 230 nm augmenta la gaussiana de 260 nm, degut a la incorporació del Cu(I) a la MT, i apareix una banda d'absorció a 290 nm. De 6 a 16 eq de Cu(I) es pot observar com continua augmentant la banda a 265 nm fins a arribar al seu màxim d'absorció per 16 Cu(I) afegits, com també incrementa l'absorció negativa a 300 nm, amb un punt isodicroic a 255 nm. Finalment, de 16 a 26 eq de Cu(I) addicionats, la gaussiana a 265 nm disminueix la seva intensitat considerablement, alhora que les bandes a 300 nm es mantenen constants.

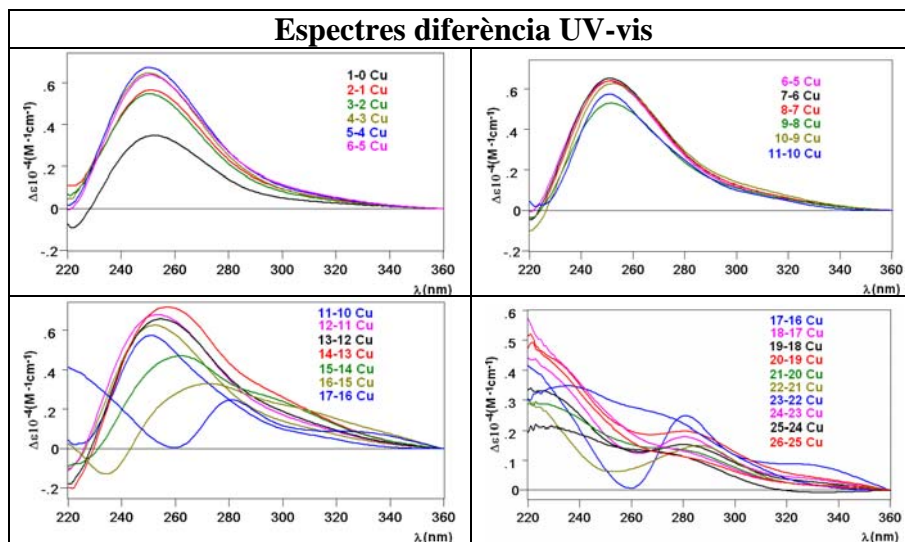
Es poden comparar els espectres de DC obtinguts de la valoració *in vitro* de Zn-CnMT1 amb Cu(I) amb les empremtes de Cu-CnMT1 *in vivo* (Figura 9), i s'aprecia que quan s'ha afegit 8 eq de Cu(I) es reproduïx l'espectre de DC de la producció a oxigenació normal, mentre que als 16 eq coincideix amb la biosíntesi a baixa oxigenació.



**Figura 9.** Comparació dels espectres de DC normalitzats de les bioproduccions de Cu-CnMT1 a oxigenació normal i baixa amb els de diferents equivalents afegits a Zn-CnMT1 en la seva valoració amb Cu(I).



Els espectres de diferència d'UV-vis d'aquesta valoració, que es recullen a la Figura 10, presenten una absorció centrada a 250 nm que es manté amb la mateixa intensitat fins al 11è eq de Cu(I) afegit, indicant la formació d'un únic cromòfor degut a l'addició de Cu(I), podent indicar també la presència d'una etapa cooperativa. Posteriorment es produeix un desplaçament gradual cap longituds d'ona superiors fins a observar-se una absorció a 280 nm al final de la valoració, indicant la formació de nous cromòfors.

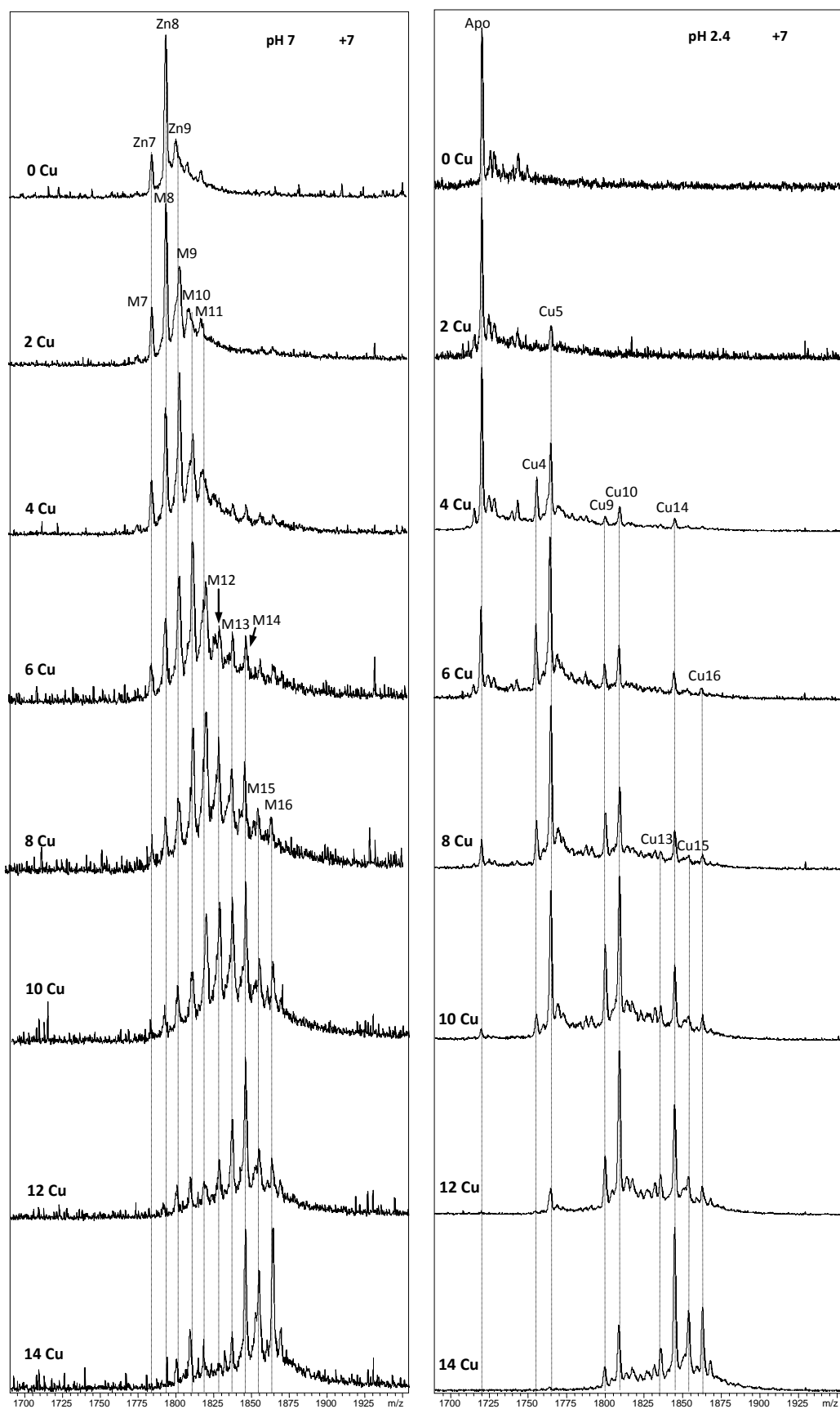


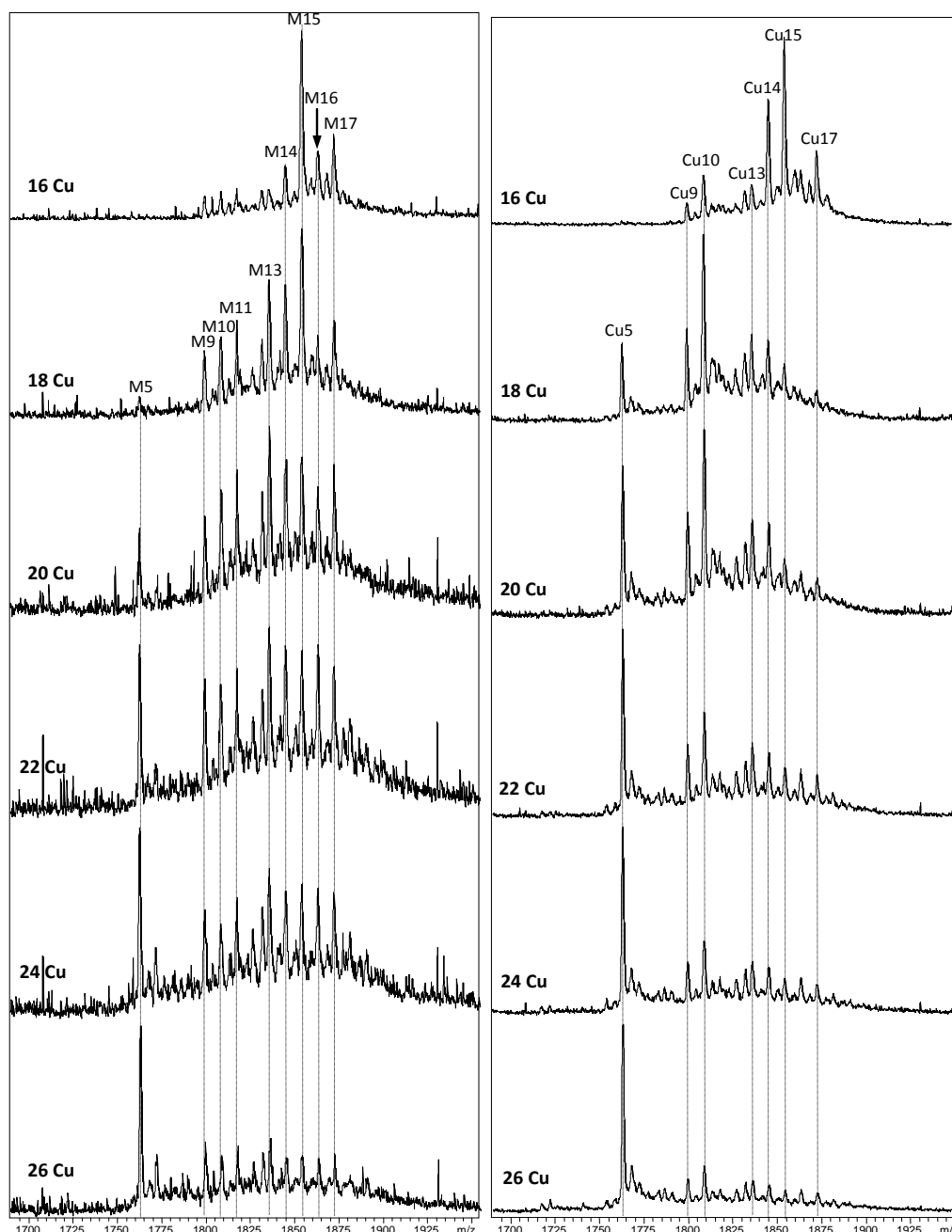
**Figura 10.** Espectres de diferència UV-vis obtinguts de la valoració d'una solució 8.89  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT1 amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

El conjunt d'espectres de masses enregistrats a partir de les al·lotes extretes al llarg d'aquesta es mostren a la Figura 11. En els espectres enregistrats a pH neutre es pot observar el desplaçament gradual del Zn(II) pel Cu(I), alhora que coexisteixen un conjunt d'espècies, el contingut metàl·lic de les quals està clarament relacionat amb la quantitat de Cu(I) afegida. És important remarcar que els espectres obtinguts a pH àcid mostren la presència de bàsicament 4 espècies al llarg de la valoració: apo-,  $\text{Cu}_5$ -,  $\text{Cu}_{10}$ - i  $\text{Cu}_{15}$ -CnMT1. També és important el fet que l'addició de més Cu(I) a partir del 18è eq dóna lloc a un conjunt d'espècies de metal·lació inferior a ambdós pHs, indicant la desestructuració o desestabilització de les espècies presents en solució (fet habitual en les valoracions amb Cu(I) de les MTs quan s'afegeix un excés de metall).

### 3.3. Valoració de Zn-CnMT1 amb Cd(II)

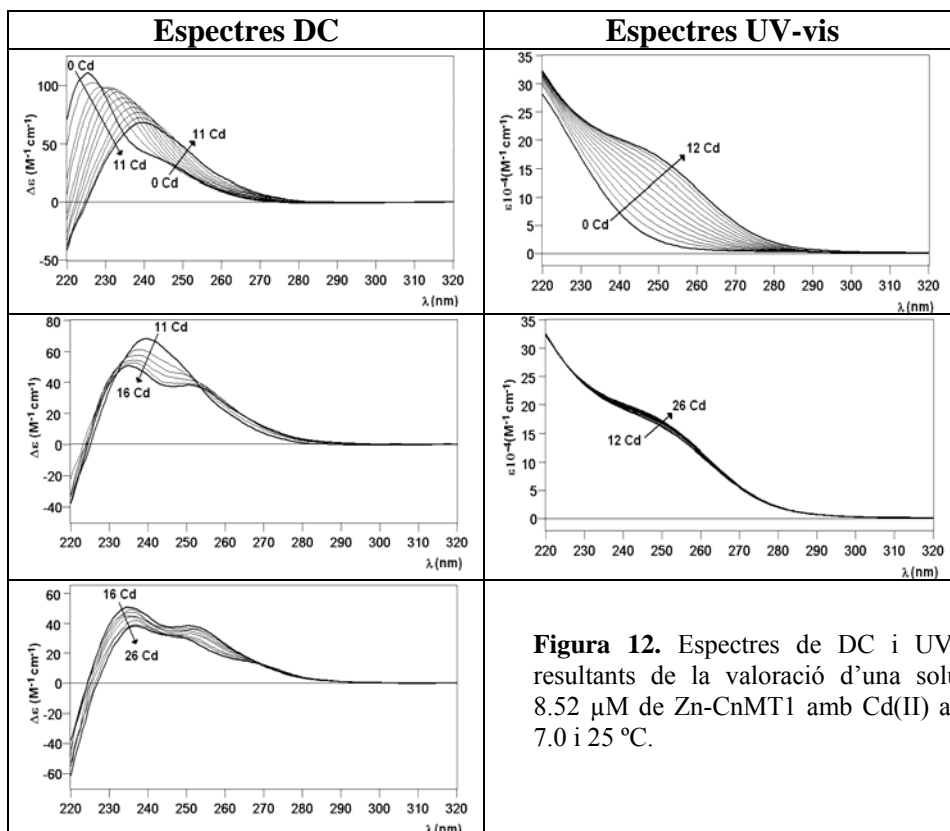
Amb la finalitat de completar l'estudi de caracterització de la isoforma CnMT1, es van afegir diversos equivalents de Cd(II) a la solució de Zn-CnMT1. Aquest experiment, amb el qual s'aconsegueix observar el desplaçament metàl·lic per un ió divalent, s'ha realitzat a pH 7.0 i a 25  $^{\circ}\text{C}$ . A mesura que s'obtenien les espècies *in vitro* de Cd-CnMT1, s'enregistraven espectres d'ESI-MS cada dos equivalents, extraient-los de la solució valorada.





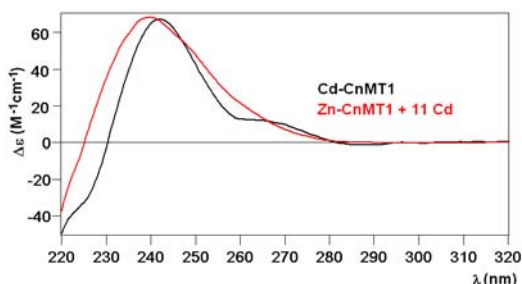
**Figura 11.** Espectres ESI-MS consecutius enregistrats al llarg de la valoració d'una solució 8.89  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT1 amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Els espectres DC i UV-vis obtinguts d'aquesta valoració (Figura 12) indiquen 3 etapes ben diferenciades. La primera etapa comprèn des de l'inici fins a 11 Cd(II), amb una clara tendència a disminuir la intensitat de la banda centrada a 230 nm a mesura que es desplaça a longituds d'ona superiors, fins a 240 nm. Seguidament, de 11 a 16 eq de Cd(II) afegits, s'observa una disminució d'aquesta última gaussiana formada fins a observar el solapament de dues bandes centrades a 235 i 255 nm. En la última fase, fins al 26è eq afegit, les bandes perden intensitat però es mantenen pràcticament constants.



**Figura 12.** Espectres de DC i UV-vis resultants de la valoració d'una solució 8.52  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT1 amb Cd(II) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

L'espècie *in vitro* d'aquesta valoració que permet reproduir l'espectre de DC obtingut de la producció de Cd-CnMT1 nativa és en l'addició de 11 eq de Cd(II), com mostra la Figura 13.

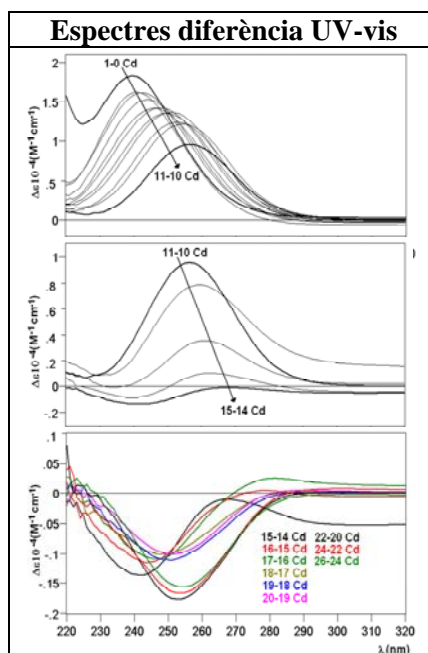


**Figura 13.** Superposició de l'empremta de DC de Cd-CnMT1 *in vivo* amb l'etapa corresponent en la valoració de Zn-CnMT1 amb Cd(II).

Els espectres de diferència d'UV-vis (Figura 14) mostren una clara disminució de la intensitat de forma constant i desplaçament de la banda cap a longituds d'ona majors, amb un comportament anàleg al dels espectres de DC fins a l'addició de 11 eq de Cd(II).

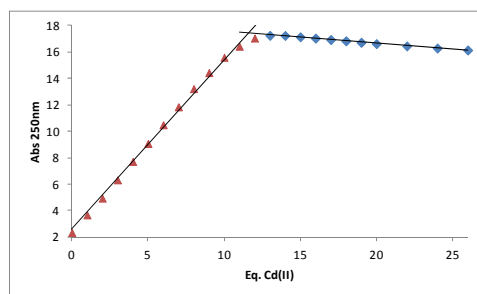
Quan s'addiciona fins al 15è eq, la disminució de l'absorció centrada a 260 nm és molt accentuada i arriba a perdre tota la intensitat.

En el darrer tram de la valoració els espectres de diferència d'UV-vis mostren increments negatius d'absorció, amb bandes de molt baixa intensitat centrades a 255 nm.



**Figura 14.** Superposició dels espectres de diferència UV-vis per a la valoració de Zn-CnMT1 8.52  $\mu\text{M}$  amb Cd(II) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Observant el gràfic de l'evolució d'absorció UV a 250 nm respecte cada equivalent de Cd(II) afegit (Figura 15) es pot confirmar el fet que al voltant de 11 eq de Cd(II) hi ha un canvi de tendència en el procés d'intercanvi metàl·lic i en el plegament proteic, com també s'ha vist en els espectres de DC.



**Figura 15.** Gràfic de l'absorbància a 250 nm per a cada equivalent de Cd(II) afegit en la valoració amb Zn-CnMT1.

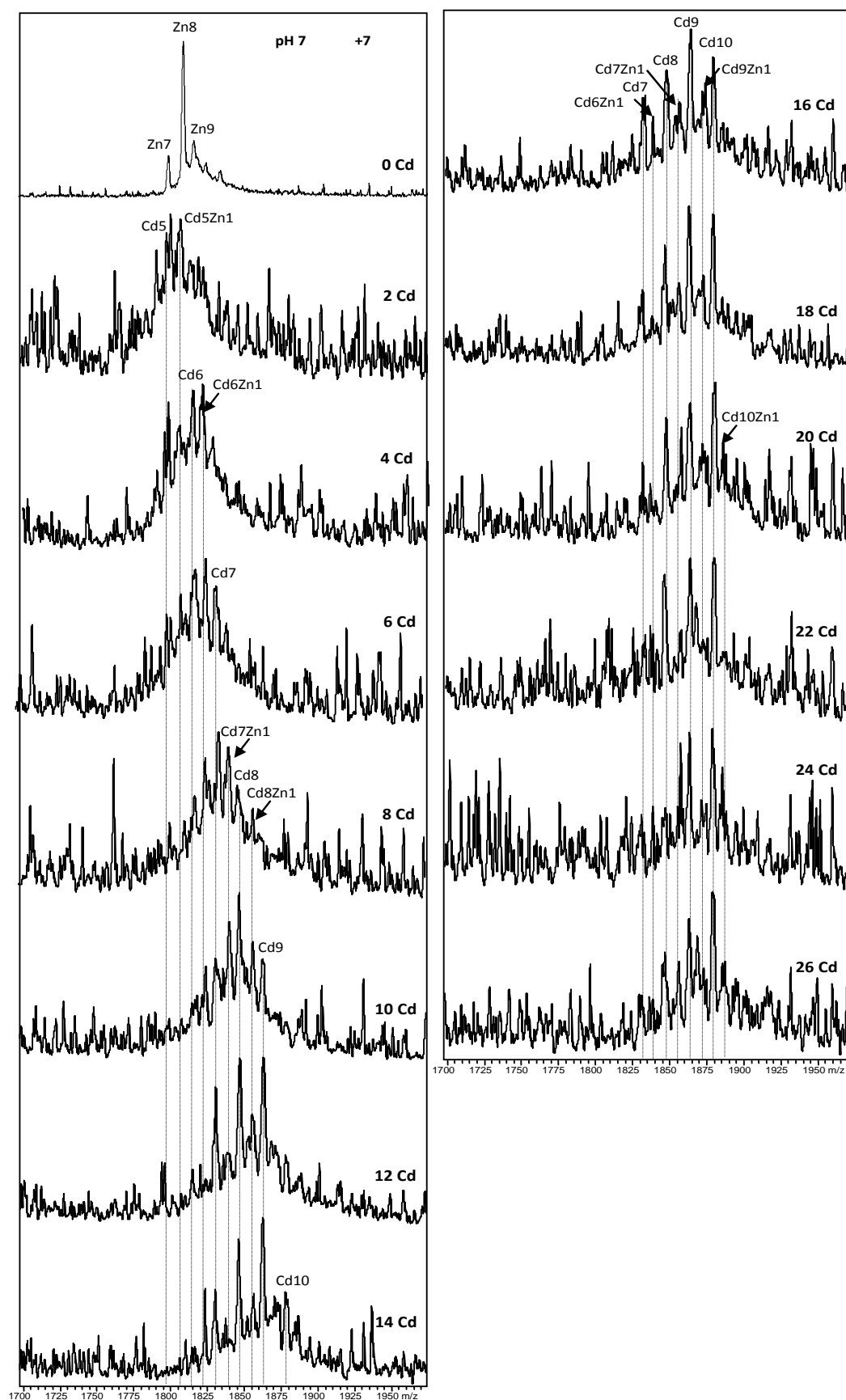
La Figura 16 inclou els espectres de masses enregistrats a pH 7.0 de les mostres extretes cada 2 eq de Cd(II) afegits a Zn-CnMT1. Cal destacar la presència d'espècies heterometàl·liques de Zn i Cd, indicatiu d'un desplaçament parcial del Zn(II) enllaçats inicialment. S'observa clarament l'augment del nombre de ions Cd(II) enllaçats a mesura que avança la valoració. Les espècies formades de van des de Cd<sub>5</sub>- fins a Cd<sub>10</sub>-CnMT1. També és remarcable el fet que a 26 eq de Cd(II) afegits, la proteïna no mostri una desestabilització de les espècies més metal·lades per donar lloc a clústers amb un nombre menor de ions coordinats o bé a la forma apo-CnMT1, sinó que Cd<sub>10</sub>-CnMT1 es manté com a majoritària.

### 3.4. Valoració de Zn-CnMT2 amb Cu(I)

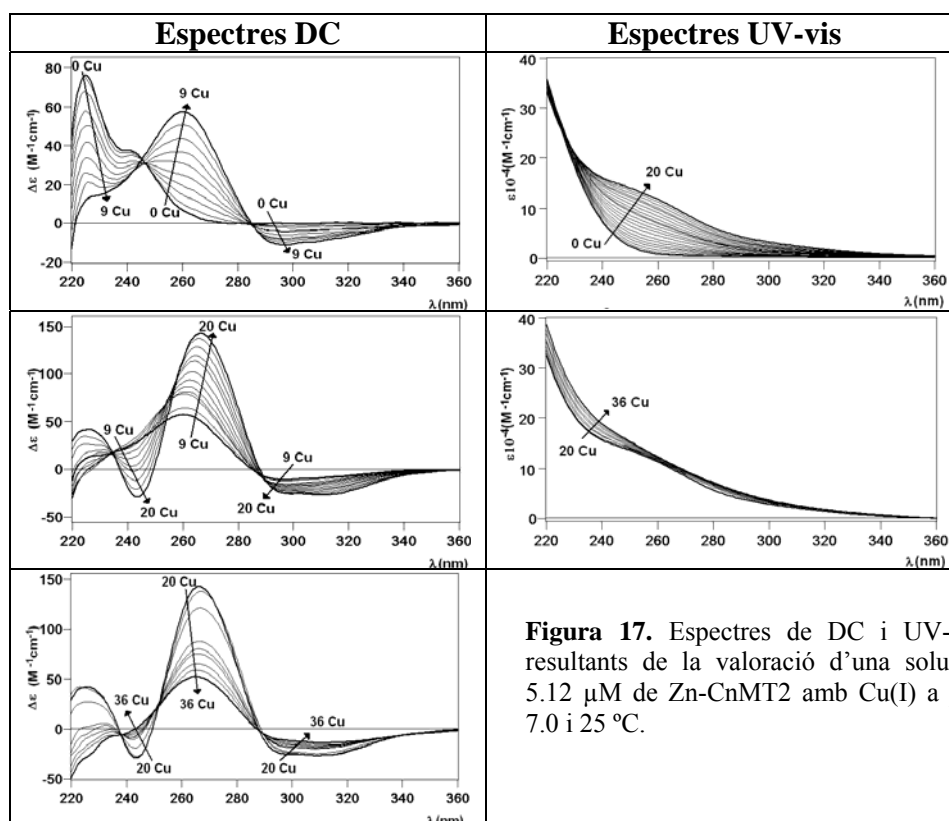
Amb l'objectiu d'estudiar la capacitat coordinant de CnMT2 es va realitzar l'experiment d'intercanvi metàl·lic sobre una solució de Zn-CnMT2 afegint diversos equivalents de Cu(I) de forma successiva, a pH 7.0 i a 25 °C de manera que en van resultar les espècies de Cu-CnMT2 *in vitro*. L'evolució del desplaçament metàl·lic va ser seguida per espectroscòpia de DC i UV-vis, i mitjançant espectrometria ESI-MS a pH 7.0 i 2.4, es van analitzar les alíquotes de la valoració cada 2 eq de Cu(I) afegits.

La Figura 17, que conté els espectres de DC i UV-vis de la valoració de Zn-CnMT2 amb Cu(I), mostra 3 etapes diferenciades. Inicialment hi ha un patró d'evolució de 0 fins a 9 eq de Cu(I) afegits, amb 3 punts isodicroics, una disminució de la banda de 225 nm paral·lel al augment de la gaussiana centrada a 260 nm. Alhora, apareix una banda d'absorció negativa cap a 300 nm. De 9 a 20 eq presenta un comportament similar als 9 primers adicionats, amb la principal diferència que desapareix el punt isodicroic, ja que els espectres es veuen desplaçats a la dreta. L'absorció ara centrada a 240 nm continua disminuint, i les bandes a 270 i 300 nm augmenten fins arribar al seu màxim d'absorció.

En la última part de la evolució seguida per DC, de 20 a 36 eq, les bandes a 240 i 270 nm perden intensitat fins a donar lloc a un espectre de bandes força amples, indicatiu del desplegament de la MT. La banda a 300 nm, es manté pràcticament constant tot incrementant lleugerament la seva intensitat.

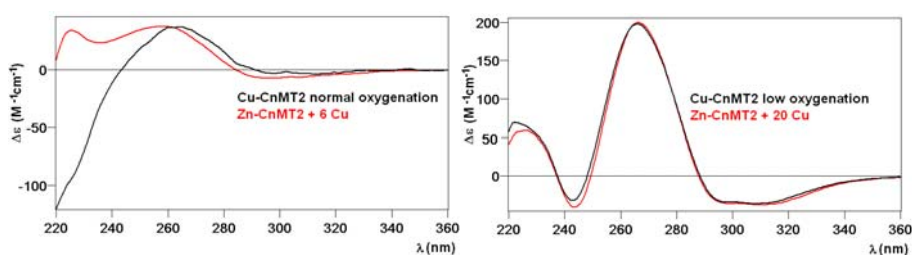


**Figura 16.** Espectres ESI-MS consecutius enregistrats al llarg de la valoració d'una solució 8.52  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT1 amb Cd(II) a pH 7.0 i 25 °C.



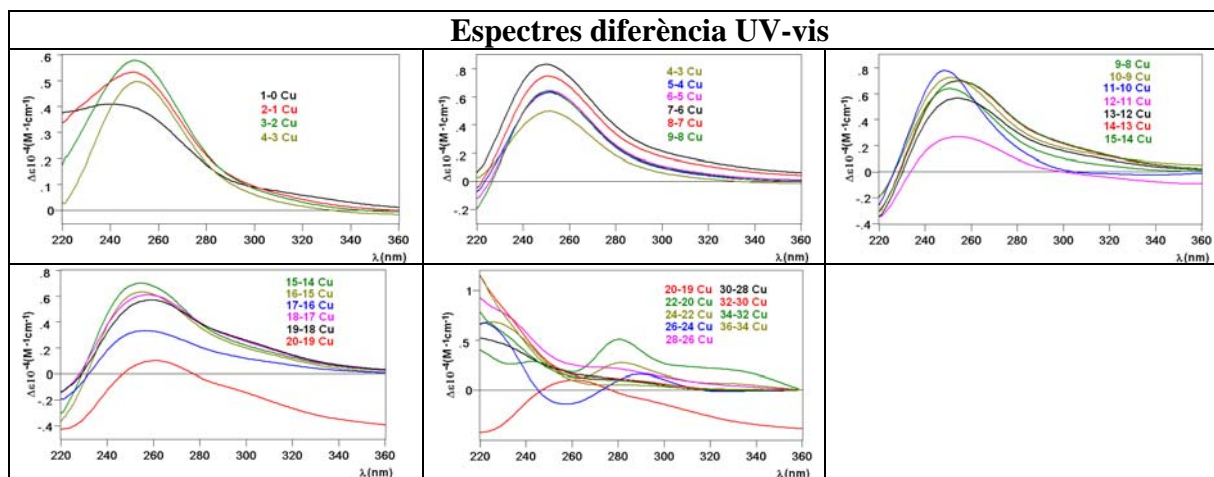
**Figura 17.** Espectres de DC i UV-vis resultants de la valoració d'una solució 5.12  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT2 amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

És interessant observar en quins equivalents al llarg de la valoració es reproduïx la producció de Cu-CnMT2 sintetitzada *in vivo*. Aquestes comparatives es troben a la Figura 18, i mostren que l'espectre a 6 eq de Cu(I) afegits és molt proper al de la producció Cu-CnMT2 a oxigenació normal, mentre que calen 20 eq de Cu(I) per reproduir, quasi a la perfecció, l'espectre de la biosíntesi de Cu-CnMT2 a baixa oxigenació.



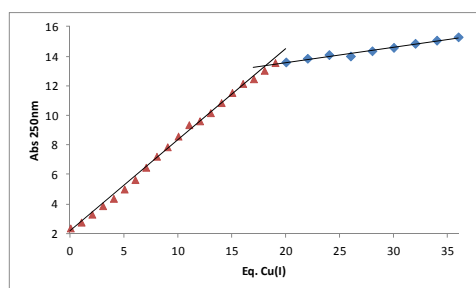
**Figura 18.** Comparació dels espectres normalitzats de DC de les espècies *in vitro* de la valoració Zn-CnMT2 amb Cu(I) que corresponen a les produccions *in vivo* i a diferent oxigenació de Cu-CnMT2.

Els espectres de diferència d'UV-vis (Figura 19) mostren una banda d'absorció centrada a 250 nm la qual pràcticament manté la intensitat fins a l'addició de l'11<sup>è</sup> eq de Cu(I), cosa que evidencia la presència d'un únic cromòfor. En els següents equivalents i fins al final, la banda és desplaçada cap a la dreta i perd intensitat. Els nous cromòfors formats expliquen la presència d'aquestes bandes a longituds d'ona superiors.



**Figura 19.** Espectres de diferència UV-vis obtinguts de la valoració de Zn-CnMT2 5.12  $\mu$ M amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}$ C.

L'evolució de l'absorció a 250 nm seguida per UV-vis, que es pot veure en la Figura 20, mostra que hi ha un canvi en l'estructura dels cromòfors a partir del 19è eq afegit.



**Figura 20.** Gràfic de l'absorbància a 250 nm per a cada equivalent de Cu(I) afegit en la valoració amb Zn-CnMT2.

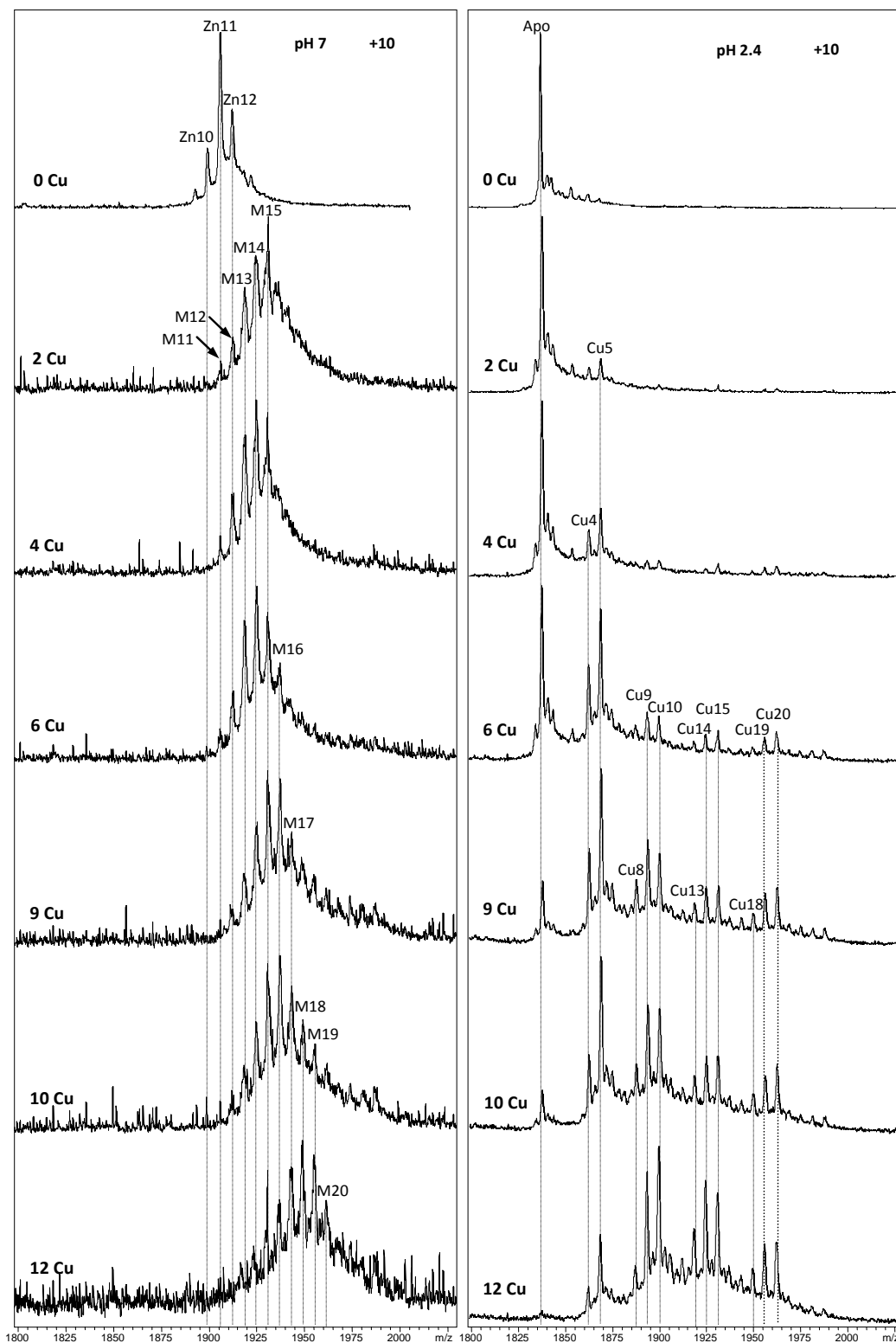
Es van extreure alíquotes per al posterior anàlisi amb ESI-MS cada 2 eq de Cu(I) afegits fins al 20è, i cada 4 eq fins al 36è. Aquestes mostres es van preparar per a ser passades a pH 7.0 i a pH 2.4 i els resultats es recullen a la Figura 21.

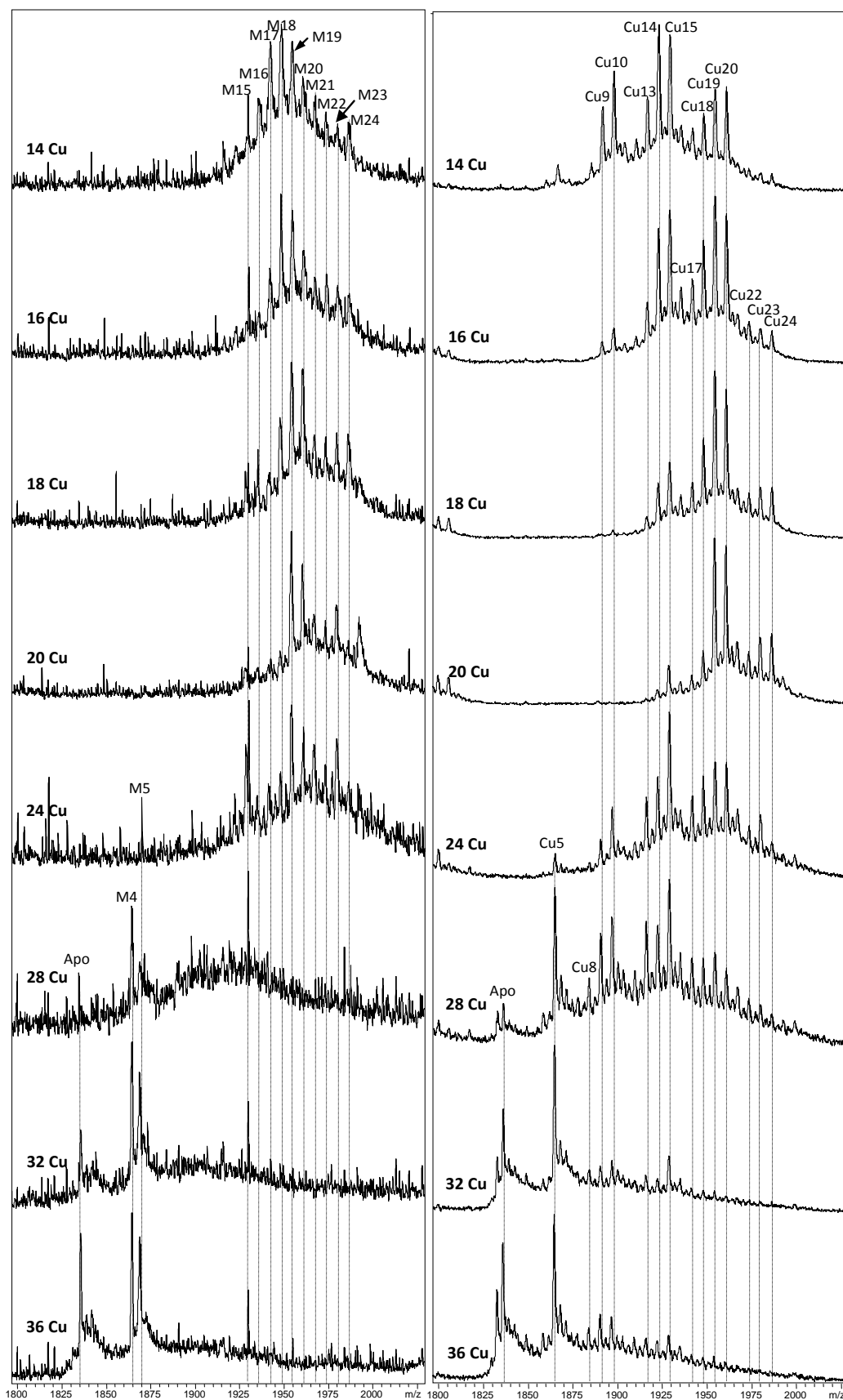
Els espectres ESI-MS enregistrats demostren un procés no cooperatiu, ja que al llarg de tota la valoració coexisteixen varies espècies amb diferents intensitats relatives, però mai se'n detecta una única com a predominant. Inicialment a pH 7.0 s'observen espècies heterometàl·liques, fent que l'addició de Cu(I) augmenti el nombre de ions enllaçats en les espècies formades (des de  $M_{11}$ - fins a  $M_{24}$ -CnMT2). A pH 2.4, en què només s'observa la coordinació de Cu(I) a les MTs, es detecten uns doblets d'espècies  $Cu_4$ - $Cu_5$ ,  $Cu_9$ - $Cu_{10}$ ,  $Cu_{14}$ - $Cu_{15}$ ,  $Cu_{19}$ - $Cu_{20}$  i  $Cu_{23}$ - $Cu_{24}$ . Aquests agregats es construeixen en base a clústers de  $Cu_5$ , com s'observa també en CnMT1, i s'arriben a formar fins a un total de 5. A partir del 16è eq de Cu(I) s'observa com l'espectre a pH 7.0 i 2.4 són pràcticament iguals, fet que indica l'intercanvi total de Zn(II) pel Cu(I) per part de la MT. Finalment es pot observar que a partir de 24 eq de Cu(I) afegits, els espectres mostren una gran especiació i menor contingut metàl·lic, fins a observar-se apo-CnMT2, cosa que permet explicar que la proteïna queda desplegada i no pren cap estructura determinada pel contingut de Zn o Cu.



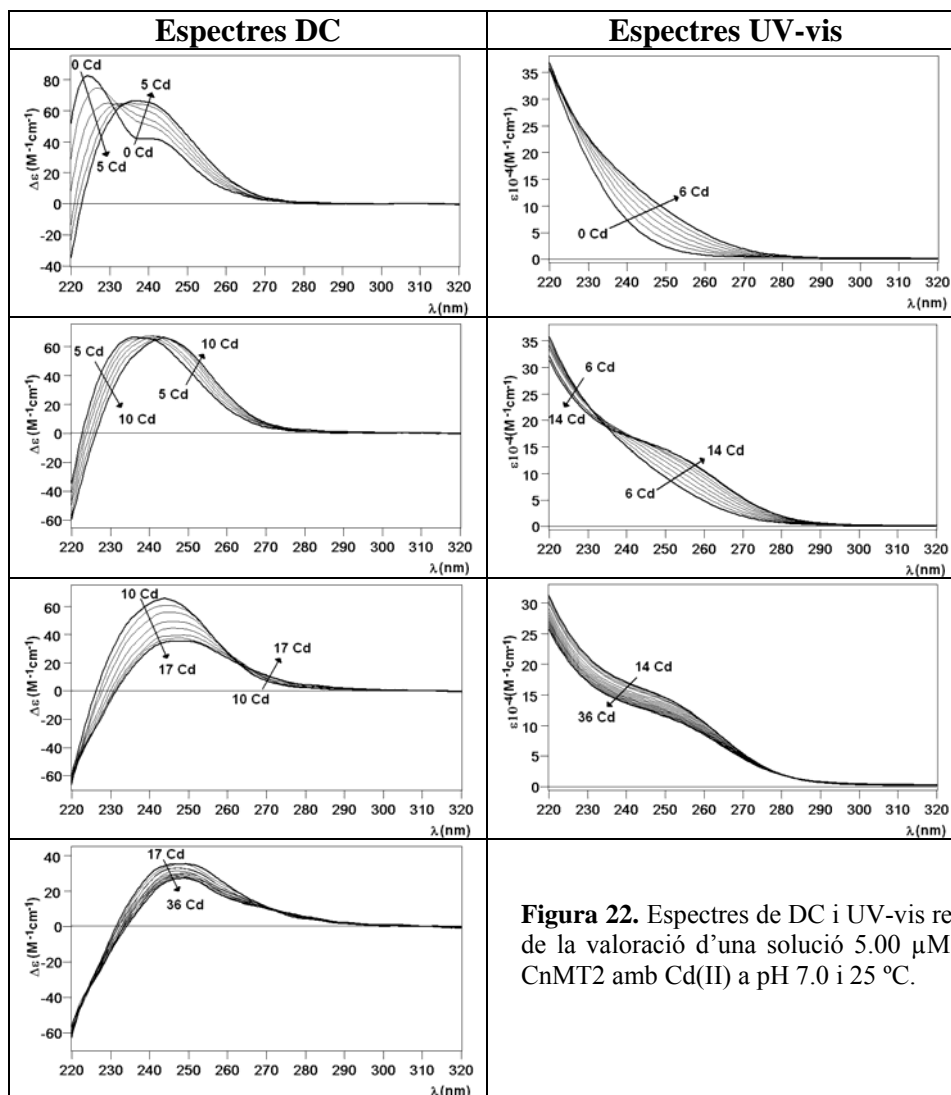
### 3.5. Valoració de Zn-CnMT2 amb Cd(II)

Per estudiar com la isoforma CnMT2 intercanvia el Zn(II) per Cd(II), es va realitzar un estudi mitjançant addicions successives d'aquest ió sobre una solució de Zn-CnMT2 a pH 7.0 i a 25 °C. L'evolució de les espècies de Cd-CnMT2 formades *in vitro* va ser seguida per espectroscòpia de DC i UV-vis, i per espectrometria ESI-MS analitzant les mostres extretes durant la valoració a pH 7.0.





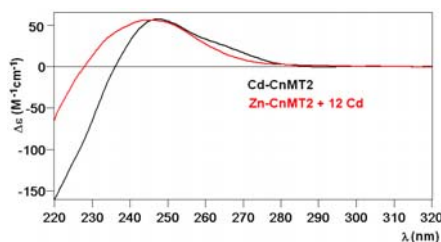
**Figura 21.** Espectres ESI-MS consecutius enregistrats al llarg de la valoració d'una solució 5.12  $\mu$ M de Zn-CnMT2 amb Cu(I) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}$ C.



**Figura 22.** Espectres de DC i UV-vis resultants de la valoració d'una solució 5.00  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT2 amb Cd(II) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

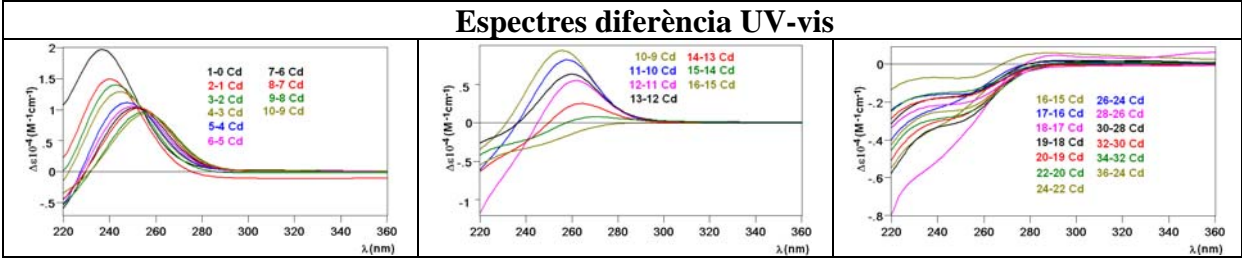
La Figura 22 recull tots els espectres de DC i UV-vis enregistrats al llarg de l'experiment. Es poden diferenciar 4 fases en aquesta valoració. Fins a 5 eq afegits de Cd(II) segueix la tendència de disminuir la banda centrada a 225 nm mentre que augmenta la banda a 240 nm. Tot seguit, del 5è al 10è eq, s'observa un desplaçament gaussiana a longituds d'ona majors d'aquesta. De 10 a 17 eq de Cd(II) la banda centrada a 250 nm perd intensitat, i fins al 36è es mantenen els espectres pràcticament constants i força amples.

Cal destacar la semblança entre l'espectre de DC de la producció recombinant Cd-CnMT2 i el de la mostra obtinguda *in vitro* en afegir 12 eq de Cd(II) a Zn-CnMT2 (Figura 23).



**Figura 23.** Comparació entre els espectres de DC de Cd-CnMT2 *in vivo* i Zn-CnMT2 amb 12 Cd(II).

Els espectres de diferència d'UV-vis d'aquesta valoració, que es mostren en la Figura 24, indiquen en els estadis inicials, fins al 10è eq, un desplaçament de les absorcions centrades a 240 nm fins a 260 nm aproximadament, i la seva disminució. Posteriorment aquesta absorció continua perdent intensitat fins al 16è eq, on aquesta és pràcticament nul·la. En el tram final de la valoració fins al 36è eq de Cd(II) afegit, els espectres de diferència d'UV-vis són molt similars i no presenten absorcions destacables.



**Figura 24.** Espectres de diferència UV-vis resultants de la valoració de Zn-CnMT2 5.00 μM amb Cd(II) a pH 7.0 i 25 °C.

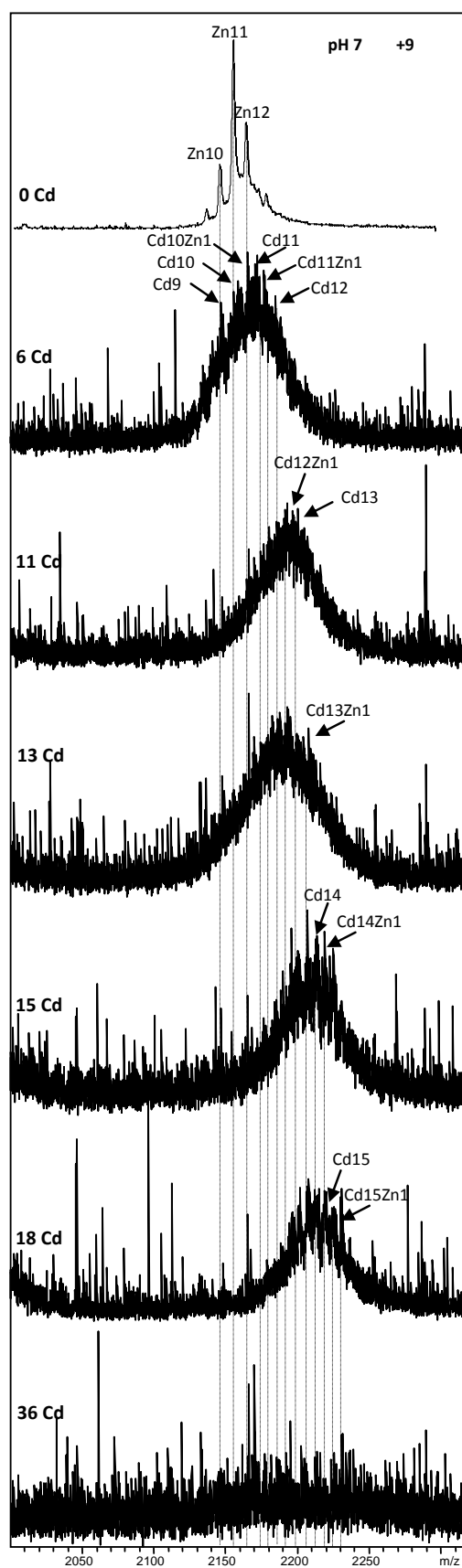
Els espectres d'ESI-MS que es recullen a la Figura 25, d'aquesta valoració mostren que en tot el procés hi ha presents espècies heterometal·liques, i que el contingut d'aquestes va augmentant en ions divalents a mesura que s'afegeix més Cd(II). Tot i que els espectres no són gaire nets, es pot veure que inicialment s'obtenen espècies de Cd<sub>9</sub>- i s'arriba a Cd<sub>15</sub>-CnMT2. És interessant remarcar que a 36 eq de Cd(II) afegits no s'observa cap espècie possiblement degut a l'oxidació de la mostra.

### 3.6. Alineament de les seqüències de CnMT1 i CnMT2

L'estudi de l'alineament entre les dues CnMTs es va realitzar amb el software Clustal 2.1, com es veu a la Figura 26. Els resultats mostren una identitat entre seqüències del 52.7% amb 99 aminoàcids iguals dels 183 totals. El nivell de semblança augmenta fins al 56.4% quan es tenen en compte aminoàcids de la mateixa família en una mateixa posició en la cadena polipeptídica.

		<b>B1</b>	
<b>CnMT1</b>	MACNPLQKNTACCCSTSEAQDKCTCQKGNCECKACPNSTKTSESG-----GKASTNCC	53	
<b>CnMT2</b>	MAFNPNPCKTTSCCSTSKAQDKCTCPKGKCECETCPKSTKTPGSGPCNCGVKEKVVSTCGC	60	
		<b>B2</b>	<b>B3</b>
<b>CnMT1</b>	GGSGEACTCPPGQCAADKCPKKAHSVSTCGGGSGAACSPPGKCAADNCPKQAQEKVSS	113	
<b>CnMT2</b>	NGSGAACTCPPGQCAADSPPRKAHSVSTCGGGSAACSPPGKCAADSPPKQAQEKVSS	120	
		<b>B4</b>	
<b>CnMT1</b>	CACSGSGAA-----	122	
<b>CnMT2</b>	CACNGSGGACTCPPGKCSGCPAQAKENPADQPTTCGCGVGVACTCPPGQCACDGCAPAKAK	183	

**Figura 26.** Alineament de la CnMT1 amb la CnMT2. En verd es marquen les Cys i en gris els fragments espaiadors.



**Figura 25.** Espectres ESI-MS consecutius enregistrats al llarg de la valoració d'una solució 5.00  $\mu\text{M}$  de Zn-CnMT2 amb Cd(II) a pH 7.0 i 25  $^{\circ}\text{C}$ .

També s'aconsegueix esbrinar una estructuració que segueix un patró format per uns fragments rics en Cys i uns espaiadors (B1, B2, B3 i B4) sense aminoàcids coordinants. De tal manera que queden perfectament alineats en les dues isoformes CnMT1 i CnMT2.

La seqüència de CnMT1 genera 3 segments de Cys que s'organitzen de la següent manera: 9Cys-7Cys-7Cys i 2Cys C-terminal. En canvi la CnMT2 mostra fins a 5 fragments rics en Cys disposats en forma de 7Cys-9Cys-7Cys-7Cys-7Cys.

Aquest fet està en concordança amb els resultats obtinguts per ESI-MS, els quals mostren espècies molt estables en forma de clústers de 5 Cu(I). Addicionalment s'observa que els 2 residus Cys en C-terminal de CnMT1 poden ser responsables de formar un enllaç feble i donar lloc a espectres ESI-MS amb espècies que difereixin en 1 Cu(I) com ara, Cu<sub>16</sub> i Cu<sub>15</sub>.

De la mateixa forma com passa amb CnMT2, les 2 Cys situades després de l'espaiador B1 permeten generar els doblets identificats per ESI-MS: Cu<sub>4</sub>/Cu<sub>5</sub>, Cu<sub>9</sub>/Cu<sub>10</sub>, Cu<sub>14</sub>/Cu<sub>15</sub>, Cu<sub>19</sub>/Cu<sub>20</sub> i Cu<sub>24</sub>/Cu<sub>25</sub>.

## 4. Procediment experimental

### 4.1. Caracterització de les proteïnes

Les proteïnes estudiades en aquest treball, CnMT1 i CnMT2, van ser biosintetitzades al Grup de Recerca dirigit per la Dra. Sílvia Atrian de la UB, mitjançant tècniques d'enginyeria genètica utilitzant com a hoste el bacteri *Escherichia coli*. Les dues isoformes de MT de *Cryptococcus neoformans* es van produir en medis rics en Zn(II), Cd(II) i Cu(II), obtenint les respectives formes Zn-, Cd- i Cu-CnMT, que hem anomenat produccions *in vivo*.

Posteriorment, les corresponents espècies Zn-CnMTs es van valorar amb Cd(II) i Cu(I) per tal d'observar els desplaçaments Zn/Cd i Zn/Cu, obtenint-se les espècies que hem anomenat *in vitro*.

La caracterització de les diferents preparacions obtingudes, tant *in vivo* com *in vitro*, ha tingut lloc mitjançant la utilització de diferents tècniques, cadascuna de les quals aporta un tipus d'informació complementària a la resta de tècniques: ICP-AES, ESI-TOF MS, DC i UV-vis. A continuació s'expliquen breument les característiques de les tècniques esmentades i les condicions experimentals emprades.

#### 4.1.1. Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció (ICP-AES)

Per tal de quantificar les proteïnes obtingudes *in vivo* s'ha utilitzat la tècnica espectroscòpica d'ICP-AES, amb la qual s'han determinat les concentracions de proteïna i les relacions molars entre cadascun dels metalls i les proteïnes.

Aquesta tècnica permet l'excitació dels electrons més externs dels àtoms amb la pròpia energia del plasma, i així quan aquests electrons es relaxen, s'observa l'emissió de radiació electromagnètica a longituds d'ona característiques de cada element. La intensitat de la longitud d'ona seleccionada està directament relacionada amb la concentració de l'element en la mostra. Aquí, amb aquesta espectroscòpia, s'ha quantificat el contingut metàl·lic de Zn, Cd i Cu i també s'ha determinat la concentració de proteïna mitjançant la mesura de la concentració de sofre, ja que el contingut de S en les proteïnes estudiades és perfectament conegut.

L'aparell utilitzat per a realitzar les mesures d'ICP-AES és un Perkin-Elmer, model Optima 4300DV (SAQ/UAB). S'han ajustat les longituds d'ona a les que pertanyen a cada element analitzat: 182.04 nm (S), 213.86 nm (Zn), 324.80 nm (Cu) i 228.80 nm (Cd).

Cal esmentar que si bé els límits de quantificació (concentracions mínimes d'analit que es poden quantificar) d'aquesta tècnica són força baixos pels metalls seleccionats, per sota de 0.05 ppm, però que en el cas del S aquest límit és força més alt, d'unes 0.5 ppm. Aquest fet, que és una de les limitacions d'aquesta tècnica analítica, fa que algunes de les mesures

quantitatives tinguin un error considerable, però les dades seleccionades sempre han mostrat uns valors de RSD inferior o igual al 5 %.

Quan s'ha utilitzat aquesta tècnica, per tal de poder quantificar de manera acurada les concentracions de les proteïnes i el seu contingut metàl·lic, així com per detectar la possible presència de lligands sulfur, s'han emprat dos procediments: el denominat "ICP Normal" i l'"ICP Àcid". Per a l'"ICP Normal" s'han agafat diferents quantitats de proteïna entre 50 i 200 µL que s'enrasen a 3 mL amb HNO<sub>3</sub> 2%, i posteriorment s'analitza la mostra. Per a l'"ICP Àcid" s'afegeix a la mostra el mateix volum de HClO<sub>4</sub> concentrat (ultrapur) com de mostra a analitzar, i s'escalfa durant 10 min a 70 °C, finalment s'enrasa a 3 mL amb HNO<sub>3</sub> 2% i es realitzen les mesures. Amb la metodologia d'"ICP Àcid" emprada s'assegura que tota la quantitat de S detectada prové únicament dels residus Cys i metionina (Met), ja que l'àcid perclòric addicionat permet eliminar els possibles sulfurs làbils presents a la mostra en forma d'àcid sulfhídric. Si els resultats obtinguts per les dues metodologies són iguals, cal considerar que no hi ha sulfur làbil a la mostra, però si entre els dos hi ha certa diferència, essent la concentració de proteïna en medi àcid més petita, es considera com a correcta la concentració obtinguda mitjançant "ICP Àcid". Finalment un cop coneguda la concentració de proteïna i dels respectius metalls de cada mostra, es pot obtenir la relació metall/proteïna.

#### 4.1.2. Espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (ESI-MS)

L'espectrometria de masses (ESI-TOF MS) ha estat emprada, tant en les mostres obtingudes en els experiments *in vivo* com en els *in vitro*, per a determinar les espècies formades, és a dir, el seu contingut metàl·lic, el nombre d'espècies presents en la preparació i la seva abundància relativa.

Les espectrometries de masses moleculars, entre elles la tècnica ESI-MS, permeten determinar el pes de les molècules de la mostra, donant com a resultat uns espectres on es representa la intensitat en funció de la relació massa/càrrega ( $m/z$ ).

En aquest treball s'ha utilitzat un aparell Bruker Daltonics, microTOF-Q, el qual disposa d'una font de ionització per electroesprai (ESI) i un analitzador de temps de vol (TOF), la qual cosa permet obtenir espectres d'alta resolució. Les condicions experimentals utilitzades han estat optimitzades per a l'anàlisi de MTs que continguin Zn(II), Cd(II) i/o Cu(I) [25].

El procediment per a estudiar les propietats coordinants de les MTs amb aquesta tècnica ha consistit en analitzar a dos valors de pH diferents: a pH 7.0 (fase mòbil acetat amònic 15 mM i acetonitril, 95:5, respectivament), de manera que s'analitzen les espècies inalterades; i a pH 2.4 (fase mòbil àcid fòrmic 5 mM i acetonitril 95:5, respectivament), pH en el qual els residus de cisteïna són parcialment protonats, desplaçant els ions Zn(II) i Cd(II) coordinats, de



manera que es poden observar les espècies totalment demetal·lades, apo-CnMTs, així com aquelles que només mantenen, si els tenien, els ions Cu(I) enllaçats.

#### 4.1.3. Espectroscòpies de dicroisme circular (DC) i d'absorció UV-vis

Les tècniques espectroscòpiques de dicroisme circular (DC) i d'absorció UV-visible s'han fet servir en paral·lel en aquest treball per obtenir les empremtes espectroscòpiques de les espècies biosinetitzades, així com per a seguir l'evolució de les espècies Zn-MTs en ser valorades amb Cd(II) i/o Cu(I), de tal manera que aporten informació sobre l'intercanvi metàl·lic i conseqüentment, de l'estructuració de la proteïna al voltant dels centres metàl·lics en les espècies formades *in vitro*.

L'espectroscòpia de dicroisme circular es basa en el canvi de configuració electrònica molecular d'un estat fonamental a un estat excitat, degut a l'absorció de radiació electromagnètica linealment polaritzada. Aporta informació sobre el plegament proteic i la quiralitat de les espècies presents en solució. En el cas de les MTs, l'esquelet proteic, que presenta un gran nombre de centres estereogènics, és l'encarregat de conferir quiralitat als ions metàl·lics units (quiralitat induïda), de manera que les bandes de transferència de càrrega lligand-metall entre els tiolats de les cisteïnes i els ions metàl·lics es poden observar per DC, les quals són molt sensibles al grau de compactació dels clústers que es formen.

L'aparell utilitzat ha estat un espectropolarímetre Jasco, model J-715, al SAQ de la UAB. Les mesures s'han realitzat a una velocitat d'escombrat de 50 nm/min, amb una resolució de 0.5 nm, i mesurant des de 200 fins a 500 nm

L'espectroscòpia UV-vis mesura les transicions electròniques de les molècules degudes a l'absorció de llum d'aquest rang de longitud d'ona. Les mesures dels espectres UV-vis s'han realitzat amb un espectrofotòmetre Hewlett-Packard, model HP8453A amb *diode array*, mesurant entre 200 i 800 nm, amb una resolució de 0.1 nm.

És ben sabut que les proteïnes absorbeixen en el rang UV-visible, observant-se un màxim a 220 nm, corresponent a les absorcions pròpies de la cadena peptídica, i un altre a 280 nm corresponent als aminoàcids que tenen residus aromàtics. Com que les proteïnes estudiades en aquest treball no contenen aminoàcids aromàtics, es pot assegurar que totes les bandes que s'observen a longituds d'ona superiors a 220 nm són degudes a les absorcions dels cromòfors metall-tiolat. Tot i que les bandes enregistrades són força amples, la qual cosa limita la informació que es pugui obtenir, es pot estudiar l'efecte de cadascuna de les addicions de metall quan es realitzen les valoracions esmentades. Així, en realitzar la diferència entre els espectres d'addicions consecutives, espectres de diferència d'UV-vis, (per exemple, l'espectre de 4 eq de Cu menys el de 3 eq, anomenat 4-3 Cu) es pot observar l'absorció generada o

perduda deguda únicament a l'addició corresponent (en l'exemple, l'addició de 4rt eq de Cu), sense tenir en compte l'efecte de tots els equivalents anteriors i de la cadena peptídica.

Per a les dues tècniques (DC i UV-vis) s'utilitzen cubetes de quars amb un camí òptic d'1 cm, i es preparen solucions de concentració propera a 10  $\mu$ M per a l'espècie CnMT1, i 5  $\mu$ M per a l'espècie CnMT2, degut al diferent nombre de Cys de cada isoforma. Durant les valoracions, per a cada addició d'equivalent metàl·lic, s'ha bombollejat amb argó la solució proteica de la cubeta per tal d'evitar l'oxidació de la mostra. Per a mesurar els blancs, tenint en compte que les solucions de proteïna contenen Tris-HCl 50 mM a pH 7.0, s'han emprat volums iguals de tampó Tris-HCl 50 mM a pH 7.0 com el que contenia la solució de mostra.

Els espectres obtinguts amb aquestes dues tècniques s'han tractat amb el software GRAMS/32 per tal de restar els efectes del tampó i la cubeta (restant el blanc), reduir el soroll dels espectres (*smooth*), i corregir l'efecte de la dilució deguda a l'addició d'agent valorant, alhora que s'han transformat els paràmetres les mesures inicials (el·lipticitat,  $\theta$ , per DC; absorbància per UV-vis) en paràmetres independents de les concentracions:  $\Delta\epsilon$  i  $\epsilon$ , respectivament.

Cal remarcar que per a totes les solucions, blancs i mostres enregistrades, s'ha fet ús d'aigua milliQ.

## 4.2. Agents valorants

Per a dur a terme les valoracions de les Zn-CnMTs, s'han utilitzat solucions de  $\text{CdCl}_2$  i de  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$ .

Per a la preparació de la solució de Cd(II) s'ha pres com a patró una solució estandarditzada 1000 ppm i s'ha realitzat la dilució fins a la concentració desitjada. Aquesta concentració ha estat verificada mitjançant espectroscòpia d'absorció atòmica en flama.

La solució del complex de Cu(I) s'ha preparat mitjançant un procediment normalitzat de treball optimitzat al nostre Grup de Recerca a partir de la síntesi de Kubas, Monzyc i Crumbliss [26]. Tot el procés de síntesi es realitza sota atmosfera de nitrogen, i el primer pas consisteix en addicionar lentament 24.6 mL de  $\text{HClO}_4$  4.6 M a una mescla de 4.0 g de  $\text{Cu}_2\text{O}$  amb 80 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Tot seguit es deixa a reflux a 100 °C i amb agitació magnètica. En aquest moment, el sòlid precipitat inicialment es redissol i un cop no s'observa més sòlid blanc cal filtrar la solució en calent. El filtrat es deixa refredar progressivament i es conserva al congelador. El següent dia es recullen els cristalls blancs del complex  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$  i es renten amb 3x10 mL d'èter dietílic. Un cop assecats al buit es guarden al dessecador sota atmosfera d'argó. Finalment la seva concentració també es determina per espectroscòpia d'absorció atòmica en flama i es comprova l'absència de Cu(II) mitjançant EPR.

## 5. Conclusions

- Les valoracions de Zn-CnMT1 i Zn-CnMT2 amb metalls monovalents i divalents com el Cu(I) i Cd(II) respectivament, demostren que aquestes dues metal·lotioneïnes de *Cryptococcus neoformans* tenen major afinitat pel Cu, tot i que no es podrien considerar Cu-tioneïnes genuïnes.
- En la valoració de Zn-CnMT1 amb Cu(I) es demostra que l'addició de 8 eq metàl·lics reproduceix la producció de Cu-CnMT1 *in vivo* a oxigenació normal, i quan s'han afegit 16 eq es mimetitza la biosíntesi de Cu-CnMT1 *in vivo* a baixa oxigenació.
- La valoració de Zn-CnMT1 amb Cd(II) permet reproduir la producció *in vivo* de Cd-CnMT1 quan s'han addicionat 11 eq d'aquest metall.
- La valoració de Zn-CnMT2 amb Cu(I) demostra que les espècies obtingudes en el moment d'addicionar 6 eq *in vitro* són comparables a la síntesi de Cu-CnMT2 a oxigenació normal, i amb 20 eq es reproduceix la producció de Cu-CnMT2 a baixa oxigenació *in vivo*.
- Quan es valora una solució de Zn-CnMT2 amb Cd(II), l'addició de 12 eq d'aquest metall permet reproduir la mescla de Cd-CnMT2 *in vivo*.
- Encara que la llargada de les dues isoformes CnMT1 i CnMT2 és diferent, ambdues presenten un alineament dels residus Cys idèntic, generant uns fragments coordinants separats per uns blocs d'aminoàcids que actuen d'espaiadors. D'aquesta manera la isoforma CnMT1 s'organitza en 3 dominis mentre que la CnMT2 ho fa en 4.

## 6. Bibliografia

- [1] <http://www.bioc.uzh.ch/mtpage/classif.html> Darrera visita: Juny 2012.
- [2] Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, Ò., Atrian, S. *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 46-62.
- [3] Stillman, M. J. *Coord. Chem. Rev.*, 1995, **144**, 461-511.
- [4] Margoshes, M., Vallee, B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4813-4814.
- [5] Romero-Isart, N., Vašák, M. *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **88**, 388-396.
- [6] Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofo, A.M. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 627-647.
- [7] Henkel, G., Krebs, B. *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 801-824.
- [8] Palmiter, R. D. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 8428-8430.
- [9] Blindauer, C. A., Leszczyszyn, O. I. *Nat. Prod. Rep.*, 2010, **27**, 720-741.
- [10] Kägi, J.H.R., Kojima, Y. *Experientia Supp.*, Birkhäuser Verlag, 1987, **34**.
- [11] Binz, B. A., Kägi, J. H. R. Dins: *Metallothionein IV*, Birkhäuser Verlag, 1999, 7-13.
- [12] Palacios, Ò., Atrian, S., Capdevila, M. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 991-1009.
- [13] Braun, W., Vašák, M., Robbins, A. H., Stout, C. D., Wagner, G., Kägi, J. H. R., Wüthrich, K. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 10124-10128.
- [14] Calderone, V., Dolderer, B., Hartmann, H-J., Echner, H., Luchinat, C., Del Blanco, C., Mangani, S., Weser, U. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 51-56.
- [15] Dolderer, B., Hartmann, H-J., Weser, U. *Met. Ions Life Sci.*, 2009, **5**, 83-105.
- [16] Capdevila, M., Atrian, S. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 977-989.
- [17] Vecchiarelli, A., Monari, C. *Mycopathologia*, 2012, **173**, 375-386.
- [18] Buchanan, K. L. Dins: *Fungal Immunology*, Springer US, 2005, 459-488.
- [19] Casadevall, A. Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*, American Society for Microbiology, 1998.
- [20] Samanovic, M. I., Ding, C., Thiele, D. J., Darwin, K. H. *Cell Host Microbe*, 2012, **11**, 106-115.
- [21] Steenbergen, J. N., Casadevall, A. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 667-675.
- [22] Ding, C., Yin, J., Tovar, E., Fitzpatrick, D. A., Higgins, D. G. Thiele, D. J. *Microbes Infect.*, 2011, **81**, 1560-1576.
- [23] Kim, B-E., Nevitt, T., Thiele, D. J. *Nat. Chem. Biol.*, 2008, **4**, 176-185.
- [24] Pagani, A., Villarreal, L., Capdevila, M., Atrian, S. *Mol. Microbiol.*, 2007, **63**, 256-269.
- [25] Pérez-Rafael, S., Kurz, A., Guirola, M., Capdevila, M., Palacios, Ò., Atrian, S. *Metallomics*, 2012, **4**, 342-349.
- [26] Kubas, G. J., Monzyk, B., Crumbliss, A. L. *Inorg. Synt.*, 1979, **19**, 90-92.